



# Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

University of Namur

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Rôle des agonistes du GnRH en superovulation ovine

Belleflamme, Aude

*Award date:*  
2005

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 23. Jun. 2020



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**RÔLE DES AGONISTES DU GnRH EN SUPEROVULATION OVINE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Aude BELLEFLAMME  
Juin 2005

## TABLE DES MATIERES

[NB. Les graphes illustrant les chapitre « matériel et méthode » et « résultats » ainsi que les « annexes » font l'objet de fichiers séparés.]

RESUME .....	5
REMERCIEMENTS.....	6
AVREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
Revue bibliographique .....	11
1 Le système reproducteur et le cycle sexuel de la brebis .....	11
1.1 Le système reproducteur .....	11
1.1.1 Vue générale.....	11
1.1.2 Ovaires .....	11
1.2 Le cycle sexuel de la brebis.....	13
2 Traitement Superovulatoire.....	16
2.1 Contrôle du moment de l'ovulation .....	16
2.1.1 Utilisation de progestagènes.....	16
2.1.2 Utilisation de prostaglandines .....	17
2.2 Contrôle du taux d'ovulation.....	18
2.2.1 Stimulation avec PMSG .....	18
2.2.2 Stimulation avec FSH et LH .....	18
2.2.3 Stimulation avec hCG .....	20
2.2.4 Immunisation contre les stéroïdes endogènes .....	20
2.3 Préparation de l'ovaire .....	20
2.3.1 Les agonistes .....	21
2.3.2 Les antagonistes .....	22
3 L'insémination .....	25
3.1 Généralités.....	25
3.2 Méthodes d'insémination .....	25
4 Collecte et transfert des embryons .....	27
4.1 Principe.....	27
4.2 Intérêt de la transplantation embryonnaire.....	27
4.3 Collecte d'embryons .....	27
4.3.1 Principe général.....	27
4.3.2 Les différentes méthodes de collecte .....	28
4.4 Conservation des embryons .....	28
4.5 Sélection des embryons .....	28
4.6 Induction de l'œstrus et de l'ovulation chez les femelles receveuses .....	29
4.7 Le transfert d'embryons .....	29
4.7.1 Facteurs de réussite du transfert .....	29
4.7.2 Les méthodes de transfert.....	30
5 Objectifs de ce mémoire.....	31
MATERIEL ET METHODE .....	32
1 Animaux utilisés.....	32
1.1 Les brebis donneuses.....	32
1.2 Les brebis receveuses .....	32
1.3 Produits utilisés .....	33

2	Plan expérimental .....	33
2.1	Objectifs des différentes expériences .....	33
2.1.1	Expérience n° 1 .....	33
2.1.2	Expérience n° 2 .....	35
2.1.3	Expérience n° 3 .....	35
3	Manipulations des animaux .....	36
3.1	Prises de sang .....	36
3.2	Pose des pompes osmotiques .....	36
3.3	Pose des éponges .....	36
3.4	Observation des ovaires .....	36
3.5	Insémination .....	37
3.5.1	Récolte du sperme .....	37
3.5.2	Insémination intra-utérine .....	37
3.6	Collecte d'embryons .....	37
3.6.1	Collecte par laparoscopie .....	37
3.6.2	Recherche des embryons .....	38
3.6.3	Conservation des embryons - Vitrification .....	38
3.7	Transfert des embryons .....	38
4	Dosage radioimmunologique (RIA) .....	39
4.1	Principe du dosage .....	39
4.2	Protocole des dosages FSH et LH .....	39
4.2.1	Protocole pour le dosage de la FSH .....	39
5	Analyses statistiques .....	40
	RESULTATS .....	42
1	Résultats de l'expérience de septembre 2004 .....	42
1.1	Résultats du blocage hypophysaire .....	42
1.1.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH .....	42
1.1.2	Les populations folliculaires .....	43
1.1.3	Analyse .....	44
1.2	Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH .....	44
1.2.1	Injections de pFSH et pLH .....	44
1.2.2	Population folliculaire .....	45
1.2.3	Analyse .....	45
1.3	Résultats du taux d'ovulation (T.O) et de la récolte des embryons .....	47
1.3.1	Le taux d'ovulation .....	47
1.3.2	Analyse .....	47
1.3.3	Le transfert des embryons .....	48
2	Résultats de l'expérience de février 2005 .....	50
2.1	Résultats du blocage hypophysaire .....	50
2.1.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH .....	50
2.1.2	Les populations folliculaires .....	51
2.1.3	Analyse .....	52
2.2	Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH .....	52
2.2.1	Injections de pFSH et pLH .....	52
2.2.2	Les populations folliculaires .....	53
2.2.3	Analyse .....	53
2.3	Résultats du taux d'ovulation (T.O.) et de la récolte des embryons .....	54
2.3.1	Le taux d'ovulation .....	54
2.3.2	Analyse .....	55

2.3.3	Collecte et transfert des embryons .....	56
3	Résultats de l'expérience de mai 2005 .....	58
3.1	Rappel des objectifs .....	58
3.2	Le Blocage hypophysaire .....	58
3.2.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH .....	58
3.2.2	Population folliculaire .....	59
3.2.3	Analyses .....	59
3.3	La stimulation ovarienne .....	60
3.3.1	Injections de FSH et LH purifiées .....	60
3.3.2	Point de vue ovarien .....	60
3.3.3	Analyse .....	61
3.4	Résultats du taux d'ovulation et de la récolte des embryons .....	62
3.4.1	Le taux d'ovulation .....	62
3.4.2	Analyses .....	63
3.4.3	La récolte des embryons .....	64
	DISCUSSION .....	65
1	Les objectifs .....	65
2	Contexte .....	65
3	Le blocage hypophysaire .....	65
3.1	La pose d'éponges de progestagène .....	65
3.2	Les agonistes du GnRH .....	66
3.2.1	Septembre 2004 et février 2005 .....	66
3.2.2	Mai 2005 .....	67
3.2.3	Analyse globale .....	67
3.2.4	Relation FSH-Population folliculaire .....	68
4	La stimulation ovarienne .....	68
4.1	Le recrutement des petits follicules .....	68
4.2	Analyse globale .....	69
4.3	Les taux d'ovulation .....	70
5	Les taux de récolte des embryons .....	71
	BIBLIOGRAPHIE .....	75

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**

**FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.4420

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Rôle des agonistes du GnRH en superovulation Ovine**

BELLEFLAMME Aude

Résumé

Afin d'améliorer les techniques de superovulation chez la brebis Texel, race de moutons la plus répandue dans notre pays, le Laboratoire de Physiologie Animale des FUNDP met en place depuis 2002 différents protocoles de superovulation. Plusieurs essais ont déjà réalisés lors des années précédentes, mais un protocole de superovulation reproductible et efficace n'est pas encore défini. Cette année, trois expériences ont été mises en place afin de poursuivre ces objectifs. Le but premier de ces expériences a été d'évaluer les effets des agonistes du GnRH et de voir quel agoniste et quelle dose permettait d'améliorer les différentes étapes du protocole de superovulation.

La première expérience réalisée au mois de septembre 2004 a utilisé de la Buséréline (100 µg/jour) et du Décapeptyl (3 mg). Le blocage hypophysaire a fonctionné d'une part sur les taux de FSH et d'autre part sur la population folliculaire. Les taux d'ovulations sont les meilleurs pour cette expérience. Lors de la seconde expérience, avec des doses plus faibles, le blocage n'a pas fonctionné à quel niveau que ce soit. Au vu des résultats obtenus lors de cette expérience, une troisième expérience a été réalisée. Des doses encore plus élevées de Buséréline ont été testées (141 µg/jour), ainsi qu'un nouveau mélange de FSH pour la stimulation ovarienne. Le blocage s'est avéré efficace tant sur les taux plasmatiques de FSH que sur la population folliculaire. Cependant, les taux d'ovulation et de récolte embryonnaire ont été nuls. Cette expérience réalisée selon un protocole semblable en mai 2004 semble avoir donné les meilleurs résultats en ce qui concerne le blocage hypophysaire. Mais un effet néfaste de la Buséréline semble exister sur la croissance des follicules. Ce manque d'efficacité dans la troisième expérience peut résulter de plusieurs facteurs : la contre-saison, l'effet inhibiteur de la Buséréline sur la croissance folliculaire lors de la stimulation gonadotrope, la formation d'anticorps contre les pFSH exogènes, la qualité des gonadotrophines injectées aux animaux et enfin les répétitions de traitements superovulatoires.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

**Promoteur:** J.-L. Bister

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux personnes suivantes pour leur aide et leur soutien lors de la rédaction de ce mémoire:

Le Professeur R. Paquay pour m'avoir accueillie dans le Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur.;

Le Professeur J.L. Bister, mon promoteur, pour son suivi permanent, son aide précieuse dans la rédaction de mon mémoire et pour ses réponses à toutes mes questions;

Marie Daix, Médecin Vétérinaire et collaborateur didactique dans le Laboratoire de Physiologie Animale, pour son soutien, son aide et sa bonne humeur quotidienne ;

Bouchaib Archa, Doctorant au Laboratoire de Physiologie Animale, pour son aide pour la réalisation des analyses statistiques, sa disponibilité et ses réponses à toutes mes questions ;

L'équipe du Centre de Recherches Ovines (CRO) et du Centre d'Insémination et de Sélection Ovines (CISO), pour leur accueil et leur aide dans la réalisation des expériences ;

Je remercie également tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue dans ce travail.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ARGG	Anti Rabbit Gamma Globulin
As	Antisérum
BSA	Bovin Serum Albumin
CA	Corpus Albicans
CAP	Chlormadinone Acétate
CISO	Centre d'Insémination et de Sélection Ovine
CJ	Corps Jaune
CPA	Cryo Protector Agent
Cpm	Coups par minutes
CRO	Centre de Recherches Ovines
Dil	Dilution
DMSO	Diméthylsulfoxyde
eCG	equine Chorionic Gonadotropin
E2	Œstradiol 17-β
ECM	Embryo Culture Medium
ER	Embryons Récoltés
FGA	Acétate de fluorogestone
FSH	Follicule Stimulating Hormone
GF	Gros Follicules
GFPO	Gros Follicule PréOvulatoire
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
hCG	Hormone Gonadotrope Chorionique Humaine
hMG	Hormone Gonadotrope Ménopausale Humaine
IA	Insémination Artificielle
IAIU	Insémination Artificielle Intra-Utérine
INH	Inhibine
LH	Lutenizing Hormone
LHRH	Lutenizing Hormone Releasing Hormone
MAP	MédroxyAcétate de Progestérone
mg	milligramme
min	minute
mm	millimètre
N <sub>2</sub> L	Azote liquide
ng	nanogramme
OCT	Ocytocine
oFSH	FSH ovine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PF	Petits Follicules
pFSH	FSH porcine
PEG:	Polyéthylène glycol
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandine F <sub>2α</sub>
PGE2	Prostaglandine E2
P.M.	Poids Moléculaire
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonodotrophin



PRL	Prolactine
PVA	Alcool polyvinylique
P4	Progestérone
RIA	Radio Immuno Assay
Spz	Spermatozoïdes
TFG	Terminal Follicular Growth
T.O.	Taux d'Ovulation
T.R.	Taux de Récolte
UA	Unité Armour
UI	Unités Internationales
µg	microgramme
VCJ	Vieux Corps Jaune

## Introduction

En raison de sa complexité et de son coût, le transfert d'embryons ne saurait prétendre remplacer l'insémination artificielle comme technique de reproduction de routine. En effet, 850 000 brebis et 75 000 chèvres sont inséminées alors que seulement une centaine de femelles de chaque espèce sont concernées par la collecte d'embryons en France chaque année. Cependant, utilisé à partir de géniteurs soigneusement choisis, le transfert d'embryons permet un progrès génétique supplémentaire non négligeable (COLLEAU *et al.*, 1998) et peut servir à des objectifs commerciaux ou sanitaires.

L'induction d'ovulations multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) nécessitent la stimulation hormonale des femelles donneuses pour produire des embryons *in vivo*. Ce mode de production a initié le développement de la technologie du transfert d'embryons, mais récemment est apparue la production d'embryons en culture après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant. Les connaissances acquises ces dernières années sur la croissance folliculaire, la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement de l'embryon ont été enrichies par le développement des techniques de biologie moléculaire (THIBAUT ET LEVASSEUR, 2001). Ces connaissances nouvelles ont contribué d'une part, à simplifier et à rendre davantage opérationnelle cette technique chez les petits ruminants pour qu'elle trouve sa place demain dans les élevages comme c'est le cas aujourd'hui chez les bovins, et d'autre part, à proposer des alternatives de production d'embryons *in vitro* pour faciliter la mise en place des nouvelles biotechnologies.

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons nous intéresser à la production d'embryons *in vivo*. Les différentes expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire se sont déroulées au CRO (Centre de Recherche Ovine) à Faux-Les-Tombes. Les brebis *Texel* ont été choisies comme donneuses car c'est la race la plus répandue en Belgique, mais aussi celle dont les éleveurs sont le plus intéressés par cette technique de pointe en sélection.

Un cycle de transplantation consiste en une série d'étapes techniques dont le but est d'obtenir à partir de quelques donneuses traitées un grand nombre de produits nés vivants après le transfert. Les femelles donneuses sont soumises à traitement de synchronisation de l'œstrus et de stimulation ovarienne pour obtenir une ovulation synchrone d'un nombre d'ovocytes nettement supérieur aux possibilités naturelles. Les ovocytes sont fécondés par de la semence de béliers de haute valeur génétique pour améliorer encore la descendance. En Belgique, ces béliers sont issus du CISO (Centre d'Insémination et de Sélection Ovine) de Faulx-les-Tombes. Les receveuses reçoivent aussi un traitement hormonal destiné à fournir un environnement utérin adapté au développement des embryons transférés. Ces embryons seront prélevés chez les femelles donneuses à un stade assez précoce et seront transférés directement ou après une étape de cryoconservation.

Afin d'obtenir un nombre d'ovulations maximum, il est impératif de mener à maturité un grand nombre de gros follicules au stade préovulatoire grâce à la stimulation ovarienne. Un grand nombre de gros follicules préovulatoires sera obtenu si un pool important de petits follicules est présent au départ de la stimulation. La création d'un pool de petits follicules va être tentée en utilisant des agonistes du GnRH (hormone hypothalamique induisant la sécrétion des hormones hypophysaires impliquées dans le contrôle endocrinien du cycle sexuel) qui vont réaliser un blocage hypophysaire, inhiber la sécrétion de FSH et empêcher la croissance de gros follicules, conduisant à une augmentation du nombre des petits follicules.

L'effet des agonistes sur le blocage hypophysaire, la réponse folliculaire, le taux d'ovulation et le nombre d'embryons récoltés sera évalué tout au long des différentes expériences réalisées chez la brebis *Texel*. De plus, des méthodes moins invasives et moins traumatisantes de collecte et de transfert d'embryons seront testées.

## Revue bibliographique

# 1 Le système reproducteur et le cycle sexuel de la brebis

## 1.1 Le système reproducteur

### 1.1.1 Vue générale

Le système reproducteur de la brebis, et de tous les mammifères femelles, est constitué de quatre grandes parties :

- l'ovaire, organe ovoïde jouant un rôle dans la production des gamètes femelles et la sécrétion des hormones sexuelles ;
- l'oviducte qui capte l'ovule et le transporte jusqu'à l'utérus et qui permet la montée des spermatozoïdes afin que s'effectue la fécondation ;
- l'utérus où va s'implanter l'embryon et se développer le fœtus ;
- le vagin, séparé de l'utérus par le cervix, qui ouvre le système reproducteur vers l'extérieur et permet la fécondation interne.

Tous les mammifères femelles présentent à un moment de leur vie une période de reproduction caractérisée par des modifications structurales et fonctionnelles de ces différentes parties du système reproducteur. Ces modifications interviennent à intervalles réguliers suivant un rythme bien défini pour chaque espèce.

Cette période dite d'activité cyclique est destinée à la production des gamètes femelles et à l'établissement de tous les facteurs et conditions nécessaires à la fécondation.

À partir de la puberté, on observe chez les femelles non gestantes trois types de modifications :

- modification au niveau des ovaires : c'est le cycle ovarien qui permet la production des gamètes ;
- modification au niveau du comportement : c'est le cycle œstrien qui est l'intervalle entre deux œstrus successifs ;
- modification hormonale : l'axe endocrinien hypothalamo-hypophyso-ovarien régule les modifications physiologiques et comportementales.

L'ovaire et ses modifications histologico-fonctionnelles, cible principale de mes recherches, va être détaillé préférentiellement aux autres parties du système reproducteur.

### 1.1.2 Ovaires

L'ovaire a une dimension de 1 à 3 cm de long pour un poids de 3 à 15 grammes. C'est un organe pair situé dans la partie inférieure de la cavité abdominale. Il possède une double fonction : il produit les gamètes femelles (ovogenèse) et il produit les hormones sexuelles qui régulent le cycle sexuel. L'épithélium superficiel recouvre l'ovaire. On peut distinguer sous celui-ci deux zones : la médulla ovarienne qui contient les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les fibres nerveuses, et la zone corticale qui contient les follicules (BISTER, 2000).

### 1.1.2.1 Ovogenèse et folliculogenèse

La gamétogenèse se déroule en deux phases.

- L'*ovogenèse* est la période pendant laquelle se constitue le stock de cellules germinales et de follicules. Chez la brebis, cette étape se déroule uniquement au moment de la vie fœtale et s'achève environ un mois avant la naissance. À ce moment, le nombre de follicules primordiaux est de l'ordre de 400 000.
- La *folliculogenèse* est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de sa réserve constituée durant l'ovogenèse, jusqu'à son involution ou sa rupture au moment de l'ovulation (DRIANCOURT *et al.*, 1991 ; LECCLERCQ, 1994).

#### 1.1.2.1.1 Modifications morphologiques

L'ovaire comporte à sa surface des follicules à divers stades de leur développement et parfois un ou des corps jaunes. On distingue classiquement cinq types de follicules : les follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux.

Les follicules primordiaux sont constitués d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculaires aplaties. Les follicules primaires constituent le premier stade de croissance des follicules. Ils sont constitués d'une ou de deux assises de cellules folliculaires cubiques. Une zone pellucide apparaît autour de l'ovocyte. Les follicules secondaires possèdent plus de deux couches de cellules folliculaires ; le diamètre de l'ovocyte et de sa zone pellucide augmente.

Les follicules tertiaires possèdent des couches cellulaires différenciées : la granulosa, la thèque interne et la thèque externe. Les follicules du stade suivant, dits antraux, possèdent des cavités remplies de liquide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa. Ces cavités grandissent jusqu'à former un antrum dans lequel fait protrusion le cumulus oophorus. Le cumulus oophorus est une excroissance de la granulosa formée de quelques assises de cellules folliculaires entourant l'ovocyte et la membrane pellucide. Ce follicule antral est le stade ultime de la folliculogenèse ; il est appelé follicule préovulatoire lorsqu'il atteint une taille à laquelle il est susceptible d'entamer le processus de l'ovulation.

Les différents follicules dégénèrent quels que soient leurs stades de développement, et laissent à la surface de l'ovaire une cicatrice appelée membrane d'atrésie ; 99 % des follicules subissent cette dégénérescence. Par contre, les follicules restants poursuivent leur croissance en devenant des follicules ovulatoires qui sont caractérisés par une reprise de la méiose de l'ovocyte. À ce stade, l'ovule se détache de la granulosa, s'entoure de mucus et flotte dans le liquide folliculaire. Au moment de l'ovulation, le liquide folliculaire se répand dans la cavité péritonéale et l'ovule est capté par le pavillon de l'oviducte. Le reste du follicule forme le corps hémorragique et constitue le premier stade du corps jaune.

Le corps jaune va ensuite avoir une phase de croissance et de sécrétion maximale, où sa caractéristique est d'être richement vascularisé (couleur rouge vif). Ensuite, il subira la lutéolyse (régression lutéale) ; sa vascularisation va diminuer et le tissu sera de couleur jaune, rosée. Quand le corps jaune a disparu, il reste une trace sur l'ovaire appelée corpus albicans (BISTER, 2000).

#### 1.1.2.1.2 Évolution temporelle

##### 1.1.2.1.2.1 Folliculogenèse primordiale ou basale

La folliculogenèse basale permet le passage des follicules du stade primaire au stade antral jusqu'à un diamètre de 2 mm chez la brebis. Elle est longue (de 5 à 6 mois), continue (50 à 80 follicules primordiaux quittent le pool chaque jour) et permanente (de la vie fœtale jusqu'à la

mort). Les facteurs initiateurs de la folliculogénèse basale sont encore mal connus (*DRIANCOURT et al., 1991*).

#### **1.1.2.1.2.2 Folliculogénèse terminale**

Le follicule ayant atteint le stade antral acquiert une dépendance vis-à-vis des hormones gonadotropes et sa croissance s'accélère brutalement. Il peut atteindre en trois ou quatre jours un stade préovulatoire et un diamètre de 6 à 8 mm. La folliculogénèse terminale est aussi appelée croissance folliculaire terminale (TFG ou Terminal Follicular Growth). Elle est constituée de différentes étapes : le recrutement, la sélection et la dominance. Le recrutement est le choix de plusieurs petits follicules antraux qui vont, à un moment donné, entamer le processus de croissance terminale. Seuls, quelques-uns atteindront la taille préovulatoire ; les autres subiront l'atréxie. C'est le phénomène de sélection qui implique le tri final et progressif des follicules préovulatoires. Ceux-ci sont alors appelés « follicules dominants » ; ils ont alors moins de chances d'évoluer vers l'atréxie. Ni le recrutement ni la sélection ne garantissent l'ovulation. Après la sélection, un ou quelques follicules dominants vont entamer un processus de maturation. Le ou les follicules menés à l'ovulation sont appelés « follicules ovulatoires ». Après l'ovulation, le corps jaune se développe comme expliqué précédemment.

Chez la brebis, le cycle ovulatoire comporte trois périodes successives de croissance folliculaire terminale. Des vagues de 5-6 jours environ conduisent chaque fois quelques follicules jusqu'au stade dominant ; cependant, les deux premières se déroulent en phase lutéale du cycle, ce qui empêche la décharge préovulatoire des hormones hypophysaires et ne permet pas à ces follicules dominants d'atteindre l'ovulation. Seule, la troisième vague voit un ou quelques follicules arriver à maturation et ovuler (*DRIANCOURT et al., 1991 ; LECLERCQ, 1994 ; NOËL et al., 1991*).

Il fut observé chez la brebis Suffolk que le processus de recrutement, sélection et dominance typique de la phase folliculaire se produit également avec la même intensité lors de la phase lutéale (*DRIANCOURT et al., 1991 ; LECLERCQ, 1994*).

### **1.2 Le cycle sexuel de la brebis**

Au terme de la phase lutéale, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sécrétée par l'utérus induit chez la femelle non gestante la régression du corps jaune ou lutéolyse. La progestéronémie chute considérablement et induit une diminution de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire par la progestérone (P4).

La gonadoréline ou GnRH produite dans l'hypothalamus présente une sécrétion de type pulsatile. Elle est contrôlée et modulée par la projection de nombreux autres noyaux du système nerveux central sensible aux variations de l'environnement externe et interne de l'individu. (*BISTER, 2000*). Les pulses de GnRH atteignent presque instantanément les cellules de l'adénohypophyse via le système porte et régulent la sécrétion des hormones gonadotropes, la LH et la FSH.

La LH est émise sous forme de pulses dont la fréquence est identique à celle de GnRH. Ce mode de sécrétion reste plus ou moins constant au cours du cycle, excepté en période préovulatoire où la fréquence des décharges augmente fortement et entraîne par sommation un pic préovulatoire. La LH contrôle la maturation des follicules ; son pic préovulatoire déclenche l'ovulation et entraîne la formation du corps jaune dont elle stimule la sécrétion de progestérone (P4).

La FSH est l'hormone hypophysaire qui stimule les follicules ovariens. Sa sécrétion n'est pas pulsatile, mais elle présente au cours du cycle des vagues de sécrétion dont une décharge périovulatoire ; ces vagues sont corrélées aux croissances folliculaires. Elle a pour rôle principal le contrôle du développement de l'ovaire ainsi que le recrutement des follicules ; elle prépare l'action de la LH en augmentant le nombre de récepteurs et elle stimule la synthèse de l'œstradiol par les follicules ovariens. De plus, elle augmente la synthèse de l'inhibine par les follicules (BISTER, 2002).

Au moment du déclenchement de la lutéolyse, une vague de FSH déclenche le recrutement de petits follicules. Plusieurs follicules antraux entrent en phase de croissance terminale. Seuls 2 à 3 d'entre eux atteignent le stade de follicules préovulatoires, les autres sont réduits à l'atréxie. Au cours de cette période de croissance folliculaire, la FSH engendre une production croissante d'œstradiol (E2). Cette augmentation d'E2 induit le comportement de l'œstrus et réalise un feedback positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui conduit à la décharge préovulatoire de GnRH, qui entraîne une production accrue de FSH et de LH débouchant sur une décharge (ou pic) ovulatoire. L'ovulation se produit 20 à 26 heures après le pic de LH.

Ayant libéré l'ovocyte, le follicule se transforme en corps jaune et se met à sécréter de la progestérone en grande quantité. La concentration en P4 reste élevée pendant 14 jours (phase lutéale), elle exerce un feedback négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et bloque le feedback positif de l'E2, ce qui empêche toute décharge ovulatoire.

La décharge pré- et post-ovulatoire déclenche le recrutement de la première vague de follicules, accompagnée d'une augmentation de sécrétion de E2 et d'INH (inhibine). L'effet inhibiteur de la P4 empêche l'action de l'E2 sur l'hypothalamus et les follicules ne peuvent pas atteindre l'ovulation. De plus, E2 et INH inhibent la sécrétion de FSH et les follicules s'atréxient.

À ce moment, la chute des taux de E2 et INH permet le recrutement d'une nouvelle vague de follicule grâce à l'élévation du taux de FSH. Ce nouveau recrutement se passe toujours lors de la période de production de P4 et l'E2 sécrétée par les follicules ne permet pas de lever l'inhibition exercée sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Au niveau de l'utérus, l'E2 va déclencher la production de PGF<sub>2α</sub> qui va entraîner la lutéolyse.

Quelques follicules de la troisième vague pourront être recrutés et atteindre l'ovulation. Le corps jaune ayant été détruit, la P4 n'exerce plus de contrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (BARIL *et al.*, 1993) et l'E2 sécrété par le follicule dominant de cette troisième vague de TFG va déclencher les nouvelles décharges ovulatoires de GnRH et de LH et FSH, ce qui induit la maturation des follicules, puis la libération de l'ovule au cycle suivant. (figures 1 et 2).

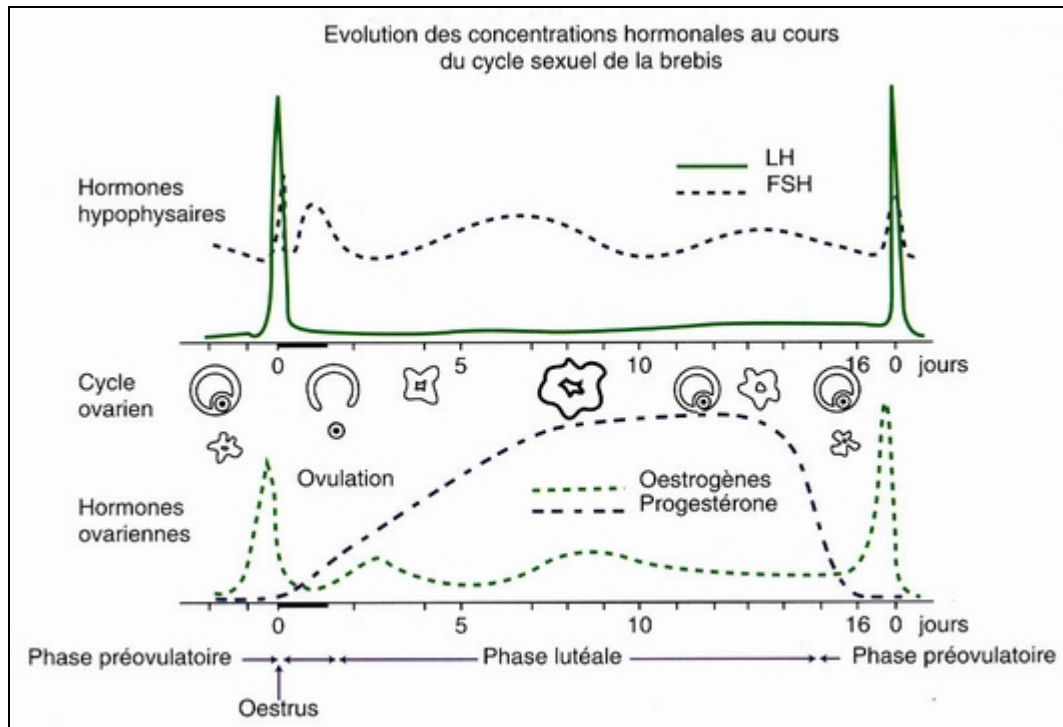


Figure 1 : Représentation schématique des différents événements physiologiques durant le cycle sexuel chez la femelle (cours en ligne sur la reproduction ovine)

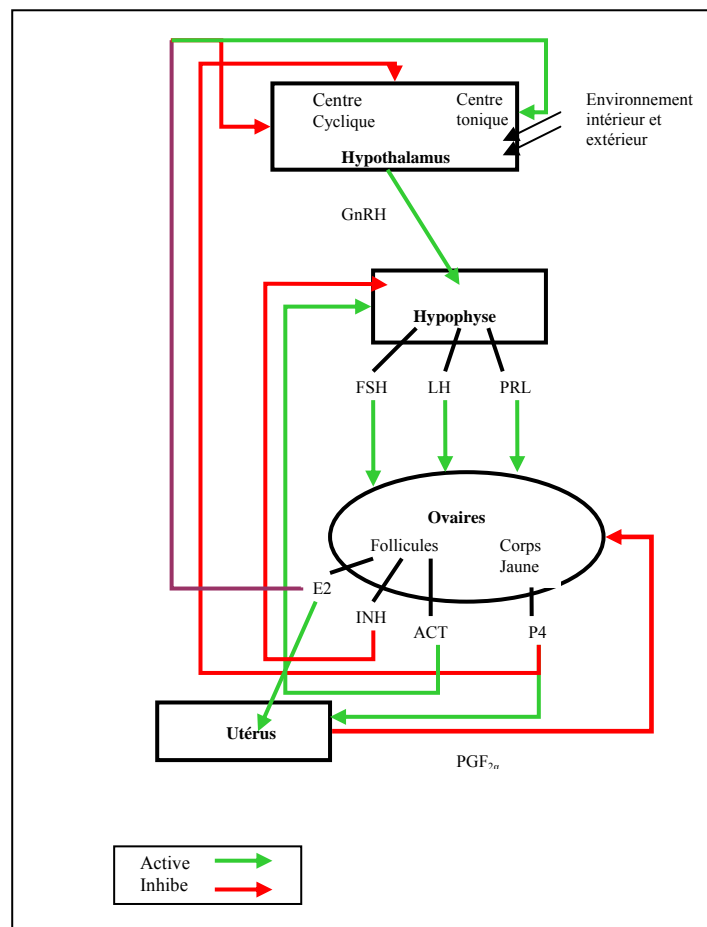


Figure 2 : contrôle endocrinien du cycle sexuel



## 2 Traitement Superovulatoire

Les différentes techniques de superovulation ont pour but d'obtenir un maximum d'ovules matures au moment de l'ovulation. Ces ovules pourront être fécondés, afin d'obtenir un grand nombre d'embryons. Ceux-ci pourront par la suite être transférés chez des brebis receveuses. Chez la brebis, les traitements de superovulation nécessaires à la production d'embryons nécessitent un timing très précis des opérations, tout particulièrement la détermination du moment de l'insémination par rapport à l'ovulation. Il est donc impératif de contrôler avec une précision maximale le moment de l'ovulation des animaux.

### 2.1 Contrôle du moment de l'ovulation

Les techniques permettant ce contrôle sont basées sur l'effet inhibiteur qu'exerce sur l'ovulation la progestérone (P4) sécrétée par le corps jaune. On distingue de ce fait deux types de procédures :

- supplémenter l'animal en P4 exogène, ce qui maintient l'inhibition de l'ovulation après la lutéolyse naturelle ;
- provoquer la lutéolyse, ce qui entraîne l'arrêt de sécrétion endogène de P4.

#### 2.1.1 Utilisation de progestagènes

La supplémentation en progestagènes permet de maintenir une inhibition des décharges pré-ovulatoires de GnRH, de LH et de FSH au niveau du système hypothalamo-hypophysaire. De plus, la P4 exogène provoque une diminution de la sécrétion de P4 endogène et une lutéolyse progressive. De la sorte, lors de l'arrêt du traitement, la progestéronémie chute rapidement et les mécanismes de rétrocontrôle positif entre les follicules en croissance sur l'ovaire et l'axe hypothalamus-hypophyse entraînent la maturation folliculaire finale et l'ovulation (BISTER, 2004).

Les progestagènes employés sont divers : outre la progestérone native, des dérivés de synthèse sont couramment utilisés ; le médroxyacétate de progestérone (MAP) et l'acétate de fluorogestone (FGA) sont les plus fréquemment utilisés. Il existe aussi le chlormadinone acétate (CAP), le norgestomet, etc. La durée du traitement chez la brebis, quel que soit le système d'imprégnation utilisé, varie en fonction de la période de l'année : 14 jours pendant la saison sexuelle et 12 jours en dehors de la saison sexuelle (BARIL *et al.*, 1993).

Différents modes d'administration peuvent être envisagés :

- a) l'administration de progestérone peut se réaliser par une injection quotidienne de 12 mg de progestérone par voie intramusculaire durant 10 à 14 jours ; cette méthode est très contraignante et peu utilisée ;
- b) les implants vaginaux sont des éponges vaginales de polyuréthane, imprégnées de 60 mg de MAP (Repromap-Upjohn) ou de 30 à 45 mg de FGA (Chronogest, Intervet) ; dans les expériences réalisées lors de cette étude, des éponges vaginales VERAMIX® contenant 60 mg de MAP ont été utilisées ; plusieurs précautions doivent être prises lors de la pose de ces éponges afin d'éviter d'éventuelles infections ; ces éponges sont retirées 10 à 14 jours après la pose ; les chaleurs sont observées 30 à 48 heures et les ovulations 56 à 60 heures après le retrait de l'éponge (ARMSTRONG *et EVANS*, 1983) ;

- c) les implants sous-cutanés sont imprégnés de 3 mg de Norgestomet (Crestar, Intervet), qui sont insérés sous la peau au niveau de la surface externe de l'oreille ; ces implants ont la même efficacité que les éponges, mais ne disposent pas d'AMM (autorisation de mise sur le marché) en Belgique.

Une étude a été réalisée chez la brebis Suffolk sur la régulation de l'activité folliculaire et de l'ovulation par des progestagènes exogènes, elle a permis de mettre en évidence une augmentation des vagues de croissance folliculaire et une diminution du nombre de gros follicules, tous deux causés par des changements de concentration en P4 qui altèrent le relargage de la LH (LEYVA *et al.*, 1998). La supplémentation en progestagènes permet donc la diminution de la sécrétion de LH, ce qui permet de retarder l'œstrus, le pic de LH et l'ovulation jusqu'au retrait de l'éponge. (GOODMAN, 1991).

LEYVA *et al.*, en 1998, ont mis en évidence un avantage non négligeable des progestagènes exogènes : les éponges vaginales imprégnées de MAP permettent d'augmenter l'intervalle entre deux ovulations, d'augmenter le nombre de vagues de croissance folliculaire, mais surtout elles permettent d'augmenter le nombre de petits follicules non-ovulatoires (PF). Cet effet est recherché dans les protocoles de superovulation et de transfert d'embryons.

### 2.1.2 Utilisation de prostaglandines

La lutéolyse peut être induite par injection de PGF<sub>2α</sub> ou d'un dérivé de synthèse. Cette hormone entraîne une modification du métabolisme des cellules lutéales, une diminution de l'irrigation sanguine du corps jaune et sa dégénérescence.

Etant donné que les prostaglandines ne sont efficaces que sur un corps jaune en activité, elles seront sans effet sur une femelle en phase folliculaire, ou sur un corps jaune en formation ou encore sur une lutéolyse amorcée naturellement. Il est donc préconisé de réaliser deux injections à 10-12 jours d'intervalle : en raison de la longueur du cycle et de la durée de la phase lutéale, tous les animaux traités seront en phase sensible lors de la deuxième injection. L'efficacité de cette technique s'avère insatisfaisante chez la brebis, elle est donc peu utilisée.

Les prostaglandines peuvent aussi être utilisées en fin de traitement avec un progestagène. En effet, afin d'éviter la persistance de CJ éventuels, des analogues synthétiques de la prostaglandine sont utilisés afin de les éliminer ; parmi eux, l'Estrumate®. Il est un puissant agent lutéolytique chez les bovins. Il est composé de 0,526 mg de cloprosténol / ml (*Compendium vétérinaire*, 2001-2002). Chez les ovins, une injection en intra-musculaire est utilisée afin d'éliminer les corps jaunes résiduels éventuels. Une dose de 100 µg ou 125 µg d'Estrumate® peut-être est injectée par animal traité le premier jour de la stimulation ovarienne (GONZALES-BULNES, 2002 et 2005 ; MITCHELL, 2002).

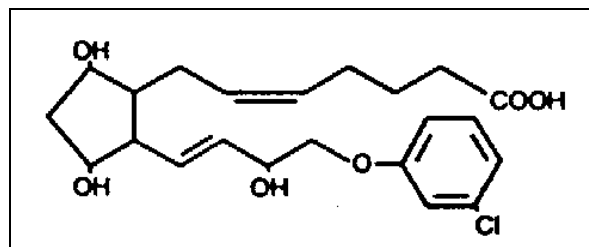


Figure 3 : Formule chimique de l'estrumate

## 2.2 Contrôle du taux d'ovulation

En fin de traitement progestatif, il est possible d'induire la superovulation (des donneuses) ou l'ovulation (des receveuses), en administrant des gonodotrophines chorioniques (PMSG) ou hypophysaire (FSH/LH).

### 2.2.1 Stimulation avec PMSG

La PMSG (Pregnant Mare's Serum gonadotropin) ou eCG (Equine chorionic gonadotropin) possède une activité de type mixte FSH et LH. La eCG est de la LH synthétisée par le placenta de la jument ; elle présente chez les autres espèces une activité FSH liée à une activité LH.

Elle favorise la maturation folliculaire et l'entrée des brebis en œstrus dans les trois jours. Elle possède une longue durée d'activité biologique (4 jours). Une seule injection en intramusculaire de 750 à 1500 UI de PMSG réalisée 48 heures avant la fin du traitement progestatif suffit à induire l'ovulation (*ARMSTRONG et EVANS, 1983*).

Chez la brebis Texel, il a été démontré que les traitements hormonaux à base de PMSG, destinés à favoriser l'ovulation, n'ont pas eu l'effet escompté avec les doses recommandées dans la littérature (*BISTER. et al, 1983*). Des essais supplémentaires ont montré que les doses de PMSG à administrer aux brebis de race Texel dépendent de la saison. En effet, chez la brebis Texel adulte, une dose de 700 à 800 UI donne la plus haute fécondité en saison normale de reproduction (septembre-octobre). En contre-saison (janvier-juin), des doses de 800 à 1000 UI sont nécessaires pour stimuler les ovaires. Il fut observé la même chose chez les agnelles, bien que les doses à utiliser soient plus faibles : 300 à 400 UI en saison, de 500 à 900 UI en dehors de la saison de reproduction (*MEERSCHAERT et al, 1988*). Chez la brebis Suffolk, une autre étude a montré que la réponse au traitement progestagènes-PMSG était variable selon la période de reproduction. En effet, le taux d'ovulation est plus élevé en saison qu'en contre-saison (*NOËL et al, 1991*).

L'utilisation du PMSG pour induire une superovulation se heurte à plusieurs inconvénients, une grande variabilité individuelle dans les réponses ovariennes et une perturbation dans les mécanismes physiologiques de la reproduction après l'utilisation de doses élevées. En effet, l'inconvénient du PMSG à fortes doses est sa rémanence due à une demi-vie particulièrement longue (26 heures). Ceci entraîne l'apparition de follicules kystiques et d'autres troubles de la reproduction. C'est pourquoi, il est souvent recommandé d'injecter à l'animal superovulé une solution d'anticorps anti-PMSG qui vont désactiver l'hormone.

### 2.2.2 Stimulation avec FSH et LH

#### 2.2.2.1 FSH et LH purifiée

La FSH habituellement utilisée est d'origine ovine (oFSH) ou porcine (pFSH). Ces deux hormones vont être utilisées dans des concentrations qui miment les conditions physiologiques. La FSH est administrée en doses décroissantes et la LH en doses croissantes. La FSH a pour rôle de stimuler la croissance folliculaire et de préparer l'action de la LH, tandis que la LH contrôle la maturation finale des follicules, provoque l'ovulation et participe au bon développement du corps jaune.

Des études ont d'abord été menées afin de savoir s'il était préférable d'administrer des doses de FSH seules ou en conjonction avec de la LH. Les doses adéquates étant aussi recherchées, il a été démontré qu'une administration de FSH seule peut stimuler la croissance folliculaire, la maturation et la production d'œstrogènes chez la brebis lors de la présence de concentrations basales de LH. Par contre, l'administration de larges doses de LH (sous forme de pulses)

inhibe l'effet stimuloire de FSH sur le développement folliculaire (PICTON *et al.*, 1990). Il a été également démontré que l'administration de LH à la fin du traitement superovulatoire avec de la FSH n'augmente pas le taux d'ovulation ou le nombre d'embryons, mais augmente le pourcentage des brebis répondant à ce traitement par des ovulations multiples ; elle diminue aussi le nombre de brebis ne montrant aucune ovulation (PICAZO *et al.*, 1996).

En raison de la courte demi-vie de la FSH (3-4 heures), il est nécessaire de répartir la dose en plusieurs injections pour induire la superovulation (BARIL *et al.*, 1993). On les administre ainsi de façon séquentielle soit 6 à 8 injections à 12 heures d'intervalle les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestatif, et la dernière injection ayant lieu 12 heures après le retrait du progestagène (COGNIE *et al.*, 2002). Il a été démontré, chez la brebis Mérimos Australienne, qu'un traitement « cocktail » associant en une seule injection la FSH avec une dose modérée de eCG (400 à 800 UI) permet d'éviter les désavantages liés à la durée d'activité biologique de chacune des gonadotrophines (RYAN *et al.*, 1991).

#### **2.2.2.2 Mélange de FSH et LH**

L'OVAGEN® est de la oFSH contenant une petite activité oLH. Il possède l'avantage d'être d'origine hypophysaire de mouton, ce qui lui permet de ne pas entraîner la production d'anticorps lors de son utilisation (ICP BIO, OVAGEN, 2005). Ce produit est commercialisé en Nouvelle-Zélande, mais n'est pas disponible en Belgique. Cependant, ce produit est utilisé avec succès dans d'autres pays afin de réaliser une stimulation ovarienne lors des protocoles de transfert embryonnaire ; comme le montrent GONZALES-BULNES *et al.*, en 2002, l'Ovagen® est susceptible d'augmenter considérablement le nombre de follicules préovulatoires. Ce nombre est d'autant plus augmenté que les doses employées le sont sous forme décroissante et non constante.

Le Stimufol® est une solution de pFSH et pLH destinée à la stimulation ovarienne des femelles bovines. Il est fabriqué par le laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULg. Le rapport pFSH et pLH de 5/1 du Stimufol® est rigoureusement standardisé et a été étudié pour garantir une bonne réponse ovarienne (*Compendium Vétérinaire*, 2001-2002). Le produit contient un mélange de 100 µg de LH et 500 µg de FSH. Les doses sont comprises entre 32 et 50 UA (Unité Armour) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bijournalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 50 UA chez la vache viandeuse (*Compendium vétérinaire*, 2001 ; Hanzen, 2005).

#### **2.2.2.3 Variabilité de la réponse au traitement superovulatoire**

Malgré les différents produits superovulatoires présents sur le marché, la variabilité individuelle en réponse aux traitements est élevée. De nombreuses études ont été réalisées afin de comparer les différents protocoles de superovulation. Il en a été conclu que la réponse aux traitements superovulatoires ne dépend pas du type du traitement FSH employé, que ce soit par injection unique de pFSH (LOPEZ-SEBASTIAN, 1999) ou par injections multiples de différents types d'FSH, OVAGEN et pFSH, associées à un traitement progestagène (GONZALES-BULNES, 2000). Par contre, la réponse est dépendante en grande partie du nombre de petits follicules présents sur les ovaires au commencement du traitement FSH. Le nombre et la viabilité des embryons seraient affectés négativement par la présence de GF au début du traitement superovulatoire (GONZALES-BULNES, 2002).

### 2.2.3 Stimulation avec hCG

Similairement à l'eCG, la hCG est la LH synthétisée par le placenta, humain dans ce cas, au cours des trois premiers mois de la gestation. Cette hormone est excrétée dans les urines sous forme biologiquement active. Par extraction des urines de femmes enceintes et purification, on obtient des préparations de gonadotrophine chorionique utilisables par voie intramusculaire uniquement. L'hCG possède un effet biologique presque exclusivement de type LH, on l'utilise lorsqu'on désire un effet LH typique (*Les inducteurs de l'ovulation, 2005*). Les hormones gonadotropes d'origine placentaire, et notamment l'hCG, possèdent des formules chimiques identiques ou très proches des hormones hypophysaires en ce qui concerne la succession des acides aminés, mais leur richesse en acide sialique leur confère une demi-vie largement supérieure (*BISTER, 2004*).

### 2.2.4 Immunisation contre les stéroïdes endogènes

Il est possible de modifier les sécrétions hypophysaires en agissant sur leur rétrocontrôle, notamment en bloquant l'activité de certaines hormones par immunisation.

On peut envisager différentes cibles pour l'immunisation.

- Immunisation contre la progestérone et l'œstradiol : elle est possible mais ne donne pas de résultats concluants du fait que le corps jaune fonctionne mal. De plus, cela engendre une mauvaise nidation de l'embryon.
- Immunisation contre le  $\Delta 4$  androstènedione : elle se réalise par injections répétées qui entraînent une réponse immunitaire chez l'animal. Celui-ci va produire des anticorps qui neutralisent ses propres sécrétions endogènes. L'androstènedione est une des étapes de la biosynthèse de l'E2 dans le follicule. Quand le follicule s'atrophie, le liquide folliculaire se concentre en androstènedione et les œstrogènes diminuent. L'androstènedione accélère cette dégradation. Son inactivation permet la survie de quelques follicules supplémentaires et augmente significativement le taux d'ovulation.
- Immunisation contre l'inhibine : elle se réalise contre la sous-unité  $\alpha$  de l'INH. Cela entraîne une augmentation des teneurs plasmatiques en FSH et en LH. En 1990, une étude a montré que l'immunisation contre l'inhibine chez la brebis est spécifique et supprime les effets endogènes de l'hormone. Les résultats concluent que l'inhibine jouerait un rôle dans le contrôle du taux d'ovulation en modulant les taux de FSH pré- et postovulatoires (*MIZUMACHI et al., 1990*). Chez la brebis, le taux d'ovulation est augmenté, par cette méthode, de 0,8 à 1,3 points. Mais il existe des variabilités individuelles importantes au niveau de la réponse (*BISTER, 2004*). *CAMPBELL et al. 1995* ont montré que, dans les 4 heures suivant l'immunisation contre l'INH, le nombre de petits follicules est augmenté significativement. Et 3 jours après le traitement, les brebis traitées présentent à la surface de l'ovaire des gros follicules (4-6 mm) qui se maintiennent jusqu'à la fin du traitement (*CAMPBELL et al, 1995*).

## 2.3 Préparation de l'ovaire

La réponse de superovulation obtenue en fin de stimulation ovarienne est corrélée positivement, comme expliqué précédemment, avec le nombre de petits follicules (1 à 2 mm) présents en surface des ovaires en tout début de traitement (*BARIL G. et al., 1993 ; VEIGA-LOPEZ, 2005*) et négativement avec le nombre de gros follicules (>6 mm) (*COGNIE et al., 2003*). Afin d'enrichir cette population initiale, un traitement peut être envisagé préalablement à la stimulation. Il existe différentes manières de modifier cette population folliculaire, mais elles sont

toujours basées sur un blocage de l'hypophyse. Celui-ci est atteint par une action sur les récepteurs au GnRH.

**pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>**

*Figure 4 : Séquence peptidique du GnRH*

Le GnRH peut être injecté dès l'apparition des chaleurs afin augmenter les décharges de LH, d'améliorer la qualité des ovulations et le développement des corps jaunes. Cependant, on peut aussi utiliser des molécules synthétiques qui agissent sur les mêmes récepteurs. Il existe ainsi deux possibilités de traitement : soit en utilisant des agonistes du GnRH, soit en utilisant des antagonistes. Si elles sont utilisées à doses suffisantes, les deux types de molécules finissent par saturer les sites et bloquer l'activité des récepteurs, réalisant ainsi une « hypophysectomie chimique » temporaire.

### **2.3.1 Les agonistes**

Le GnRH d'origine hypothalamique n'exerce son action stimulante sur l'hypophyse que grâce à son mode d'action pulsatile. Son administration continue aboutit à un effet de saturation des récepteurs hypophysaires. Il y a donc blocage de la sécrétion de FSH et LH (HEDON et al., 1986). Les agonistes du GnRH, dérivés de synthèse par substitution d'un acide aminé dans la chaîne du décapeptide, exercent les mêmes propriétés que le GnRH elle-même, mais ont l'avantage d'avoir une demi-vie plus longue (MCLACHLAN, 1986) ; il est plus aisé encore de les utiliser comme inhibiteurs.

#### **2.3.1.1 La Buséréline**

La Buséréline (SUPREFACT®, RECEPTAL®) est un analogue synthétique très actif du GnRH. La substitution d'un acide aminé donne à la molécule une plus grande affinité pour les récepteurs hypophysaires de la GnRH. La sécrétion de gonadotrophines et des hormones sexuelles augmente immédiatement après l'administration de Buséréline.

**pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Ser-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>**

*Figure 5 : Séquence peptidique de la Buséréline*

La Buséréline est un superagoniste du GnRH ; elle conduit à la suppression de la sécrétion des gonadotrophines et des hormones sexuelles due à une down-régulation des récepteurs du GnRH au niveau hypophysaire. Un traitement continu par la Buséréline provoque une régression de la sécrétion d'œstradiol et de la fonction ovarienne (Compendium, 2002). Chez la femme, la Buséréline est administrée lors de traitements de procréation médicalement assistée pour inhiber les gonadotrophines endogènes avant de réaliser une stimulation exogène. La posologie quotidienne recommandée est de 900 µg par voie intranasale en trois administrations par jour.

Le stade final et le développement de la croissance folliculaire, chez la brebis, sont dépendants de la concentration environnementale en gonadotrophines. Cette théorie est appuyée par les résultats obtenus en 1987 par MCNEILLY et FRASER. Ils ont démontré que la croissance des follicules de plus de 2,5 mm est inhibée par la suppression spécifique de la LH et de la FSH par un traitement chronique avec de la Buséréline (50 µg/jour). Ceci fut confirmé par PICTON et al en 1990 qui ont montré une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) des taux de FSH et une diminution significative des taux de LH ( $P < 0,05$ ) chez la brebis « Welsh moutain » après traitement avec de la Buséréline. L'administration chronique d'un agoniste diminue ainsi les taux de FSH de 40 à 70 % par rapport au taux normal de la phase lutéale et inhibe le relargage pulsatile de LH.

Chez la brebis Lacaune, il est recommandé d'utiliser 40µg/jour pendant les 15-17 jours précédant la stimulation ovarienne (BREBION et COGNIE, 1989). Un traitement avec la Buséréline (40 µg/jour) pendant 2 semaines supprime les gros follicules, double le nombre des petits et augmente la réponse à la FSH de 50 %. La synchronisation de l'œstrus apparaît entre 20 et 24 heures après le retrait de l'éponge de progestagène (COGNIE et al., 2003).

Le traitement chronique est réalisé par infusion sous-cutanée à l'aide de pompes osmotiques qui permettent un relargage constant de Buséréline. L'efficacité du blocage antigonadotrope ainsi réalisé se traduit par un doublement du pool de follicule de 1-2 mm. L'avantage d'un traitement à base d'agonistes du GnRH est, d'une part, la formation d'une cohorte uniforme de follicules et, d'autre part, une diminution de la variabilité individuelle qui est souvent observée dans les programmes de superovulation et de transfert d'embryons (EVANS et al., 1994).

### 2.3.1.2 La triptoreline

Le DECAPEPTYL® est composé de triptoréline. Celle-ci est un décapeptide analogue du GnRH qui, initialement, stimule la libération des gonadotrophines hypophysaires. Les études conduites dans l'espèce humaine et animale ont montré qu'après une stimulation initiale, l'administration prolongée de triptoréline entraîne une inhibition de la sécrétion gonadotrope supprimant par conséquent les fonctions hypophysaires et ovariennes.



*Figure 6 : Séquence peptidique de la triptoreline*

Ce médicament est utilisé en thérapie humaine pour les cas suivants : traitement du cancer avancé de la prostate, de l'endométriose, des fibromes utérins. Dans le cadre de la fécondation médicalement assistée (FIVETE, GIFT, ZIFT), une injection de « Décapeptyl sustained release 3,75mg » entraîne une inhibition des pics de LH endogènes intercurrents. En cas de traitement associé par des gonadotrophines exogènes (hMG, FSH, hCG), on obtient une meilleure folliculogenèse, un meilleur recrutement folliculaire, une chronologie plus régulière du prélèvement des ovocytes et, par conséquent, un meilleur pourcentage de grossesses par cycle. Chez la femme, la posologie recommandée est d'une injection intramusculaire administrée à partir du deuxième jour du cycle. (Compendium, 2002)

Des chèvres de race Alpine prétraitées avec du Décapeptyl® à effet retard (1,8 mg, 22 jour avant FSH) ont présentés une diminution du nombre des GF sur les ovaires ( $P < 0,01$ ), sans effet sur le nombre de PF et sur la réponse ovulatoire à FSH. Les taux d'œufs collectés et d'œufs fécondés ayant été significativement diminué, un faible nombre d'embryons a obtenu par chèvre prétraitée avec l'analogue du GnRH. Les nombres de PF et d'ovulations après induction de la superovulation n'ont pas été augmentés contrairement à ce qui a été observé chez la brebis (Baril et al., 2004).

### 2.3.2 Les antagonistes

Les antagonistes du GnRH sont aussi des décapeptides de synthèse. Ils se fixent sur les récepteurs hypophysaires au GnRH et bloquent l'effet de l'hormone endogène. Ils bloquent donc la libération des gonadotrophines par l'hypophyse. Le mécanisme d'action dépend de l'équilibre qui existe entre le GnRH endogène et l'antagoniste administré (FELBERBAUM et al., 2000).

### 2.3.2.1 L'Antarelix ou Tévérélix

Le plus connu est l'Antarelix ou Tévérélix®. C'est un antagoniste soluble du GnRH (*DEGHENGI et al.*, 1993). C'est un antagoniste de la « troisième génération » caractérisé par une action rapide et directe, ainsi que par son affinité 9 fois plus grande que le GnRH lui-même pour les récepteurs au GnRH (*NELSON et al.*, 1995).

#### AcDNal-DPhe(pCl)-Dpal-Ser-Tyr-DHci-Leu-Lys(iPr)-Pro-DAla-NH<sub>2</sub>

Figure 7 : Séquence peptidique de l'Antarelix

En 1991, *DITTKOFF et al.* ont montré que les antagonistes du GnRH, administrés sur une courte période, sont capables de supprimer le pic de LH lors de l'ovulation. Ils ont observé une disparition du pic de LH, une diminution de moitié de la concentration d'œstradiol et une interruption de la croissance folliculaire. De plus, les traitements n'ont pas déplété les réserves de FSH et LH des cellules gonadotropes ni inhibé la synthèse des gonadotrophines. Les taux de fertilité et de grossesse obtenus par suite de traitement avec les agonistes dans des protocoles de FIV sont comparables à ceux obtenus lors de l'utilisation des agonistes.

Une injection quotidienne d'Antarelix de 0,5 mg pendant 10 jours (*COGNIE et al.*, 2003) réprime complètement la pulsativité de la LH dans les 4 heures et maintient des niveaux de base pendant 4 à 8 jours, tandis que la FSH diminue progressivement pour atteindre un minimum environ 4 à 6 jours après l'injection.

Appliqué chez la brebis de race Lacaune, un pré-traitement à l'Antarelix de 50 µg/jour permet d'éliminer les faibles réponses (moins de 5 ovulations), assure en moyenne la production de 10 embryons transférables et la naissance de 6 à 7 agneaux par donneuse traitée (*COGNIE et al.*, 1999). La variabilité du taux d'ovulation ( $22,3 \pm 7,5$ ) demeure élevée, mais le nombre d'ovulations chez une même donneuse est hautement répétable avec ce protocole ( $r = 0,76$ ) ; il est possible que cette variabilité entre donneuses reflète des différences génétiques dans l'aptitude à la superovulation (*COGNIE et al.*, 2000).

La simplification du prétraitement anti-GnRH (Antarélix) par réduction du nombre d'injections (1,5 mg, 0,5 mg et 0,5 mg espacés de 5 j) n'induit pas une diminution de la réponse ovulatoire à FSH par rapport au traitement de référence ( $11 \times 0,5$  mg/j) mais la production d'embryons par brebis a tendance à diminuer ( $12,0$  vs  $8,3$ ) (*Baril et al.*, 2004).

Cette suppression de la pulsativité de LH, associée à une diminution des taux de FSH, peut avoir un avantage intéressant, l'augmentation du nombre de PF. Celle-ci est réalisée de deux manières. D'une part, par l'élimination des follicules dominants et, d'autre part, en bloquant la croissance des petits follicules en réponse à la FSH. Enfin, il est possible que le traitement favorise l'émergence de PF. Il est en effet connu que des pulses de LH de hautes fréquences empêchent la FSH de stimuler la croissance de multiples follicules. Donc, la diminution de la pulsativité de la LH par un antagoniste du GnRH permettrait l'émergence des PF en réponse à la sécrétion résiduelle de FSH (*LOPEZ-ALONSO C.*, 2005).

Cette étude a permis également de montrer que l'injection d'une dose unique d'Antarelix est plus pratique pour augmenter l'efficacité des protocoles superovulatoires et ainsi augmenter le nombre de PF. Cependant, une dose unique peut provoquer des effets « néfastes » sur la croissance et le développement folliculaire, c'est pourquoi ce mode d'administration de l'antagoniste n'est pas utilisée en pratique.

L'Antarelix provoque toute une série d'effets secondaires chez l'homme, il est donc préférentiellement utilisé chez l'animal.



### 2.3.2.2 Le Cétrorelix

Le Cétrorelix (commercialisé sous l'appellation Cetrotride®) produit une suppression de la sécrétion de LH après 1 heure avec une dose de 3 mg et après 2 heures avec une dose de 0,25 mg. Il est utilisé en pharmacologie humaine.

**AcDNal-DPhe(pCl)-Dpal-Ser-Tyr-Dcit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH<sub>2</sub>**

*Figure 8 : Séquence peptidique du Cétrorelix*

Cette suppression peut être continue si le traitement avec l'antagoniste est poursuivi. Il possède un effet sur la LH plus prononcé que celui sur la FSH. Les effets de ce produit sont réversibles et ils s'arrêtent en même temps que le traitement cesse. Chez la femme, le Cétrotrid® retarde le pic de LH et donc l'ovulation d'une manière « dose dépendante » (*Rxlist.com, 2003*).

### 3 L'insémination

#### 3.1 Généralités

La fécondation des donneuses fait le plus souvent appel aux techniques de l'insémination artificielle, permettant de valoriser la semence des mâles dont la valeur génétique est connue. Comparées au cas classique de l'insémination de femelles synchronisées, les conditions de réalisation de l'insémination des donneuses fortement superovulées doivent être encore mieux contrôlées (BARIL *et al.*, 1993). En effet, il est clairement démontré que le transport et la survie des spermatozoïdes dans les voies femelles sont perturbés après traitement progestatif associé à l'induction de la superovulation (EVANS *et* ARMSTRONG, 1984).

#### 3.2 Méthodes d'insémination

Après collecte, analyse, conditionnement et mise en conservation, le sperme peut être utilisé pour des inséminations artificielles.

Le dépôt de la semence doit être effectué de façon à ce que les spermatozoïdes se trouvent sur le lieu de fécondation au bon moment pour pouvoir pénétrer l'ovule, car la durée de vie des gamètes est très courte : ce paramètre est donc à prendre en compte lors du choix du moment optimum de l'insémination artificielle (BARIL *et al.*, 1993).

Plusieurs techniques d'insémination artificielle existent :

- *L'insémination exocervicale.* Le sperme est déposé au niveau du vagin le plus profondément possible à l'entrée du col de l'utérus. Pour cette technique, le nombre de spermatozoïdes déposés doit être élevé (400 millions) étant donné que le col de l'utérus est difficile à franchir. Auparavant, on réalisait généralement deux inséminations espacées de 8 à 12 heures. On observe actuellement que le taux de réussite n'est pas significativement inférieur si on réalise une seule insémination, généralement 54 heures après la fin du traitement progestatif de synchronisation de l'ovulation. (GORDON, 1997). Mais le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée (ARMSTRONG *et* EVANS, 1984) et le taux de fécondation après une IA cervicale est corrélé négativement au taux d'ovulation.
- *Le dépôt cervical ou utérin.* Le sperme est directement déposé dans l'utérus de l'animal. Cette technique n'est appliquée que chez les animaux permettant une traversée aisée du cervix. Ce n'est pas le cas chez la brebis.
- *L'insémination intra-utérine par laparoscopie.* Le sperme est déposé dans les cornes utérines. Cette technique permet l'utilisation d'une quantité moindre de spermatozoïdes (20 millions par corne) que dans le cas de l'insémination artificielle par voie cervicale. L'IAIU a lieu 48 à 60 heures après la fin du traitement progestatif (BARIL *et al.*, 1993). Cette méthode permet d'obtenir des taux de fécondation élevés chez les donneuses ayant moins de 30 ovulations (COGNIE *et* BARIL, 2002).

La semence peut être déposée par laparotomie (ouverture chirurgicale de la cavité abdominale) ou par laparoscopie (introduction d'une fibre de verre dans la paroi abdominale). La laparotomie est une méthode invasive. Qu'elle soit utilisée pour l'observation des ovaires, l'IA ou la récolte et le transfert d'embryons, cette méthode présente un désavantage majeur (MCMILLAN *et* HALL, 1994) ; en effet, les adhérences post-opératoires sont fréquentes et peuvent diminuer les performances reproductives des animaux opérés. Mais elle permet de transférer rapidement les embryons chez les petits ruminants (15 à 20 par heure) (MCMILLAN *et* HALL, 1994).

La laparoscopie est moins traumatisante. Cette technique permet l'exploration interne des cavités corporelles ou des conduits naturels ou des canaux ; elle inclut un système optique utilisant les propriétés de propagation de la lumière dans une fibre de verre. Lorsque la brebis a subi un traitement superovulatoire et que le nombre d'ovulations est susceptible d'atteindre la vingtaine, l'IA par laparoscopie est indispensable et la dose de spermatozoïdes est portée à 100 millions par brebis.

## 4 Collecte et transfert des embryons

### 4.1 Principe

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle dont le principe revient à transférer avant l'implantation les embryons générés par une femelle donneuse (mère génétique) chez des femelles receveuses (mères porteuses) qui en assurent le développement jusqu'au terme (BARIL *et al.*, 1993).

Cette procédure comporte différentes étapes :

- induction d'une superovulation chez les femelles d'élite ;
- insémination artificielle de ces dernières ;
- collecte des embryons ;
- conservation des embryons ;
- synchronisation des receveuses ;
- transfert d'embryons.

### 4.2 Intérêt de la transplantation embryonnaire

Dans le milieu animal, la transplantation embryonnaire permet d'augmenter le nombre de descendants par femelles ayant un haut potentiel génétique. Elle est donc un outil de choix tant pour la création que la diffusion du potentiel génétique. Pour tous les échanges de gènes, la voie du transfert embryonnaire est plus économique et surtout très sécurisante sur le plan sanitaire. L'embryon transféré au stade morula ou blastocyste bénéficie d'une protection naturelle contre les agents infectieux constituée par la zone pellucide (COGNIE *et BARIL*, 2002). Cette méthode permet également de sauvegarder les espèces en voie d'extinction. De plus, la possibilité de multiplier la descendance de femelles de haute valeur économique ouvre au transfert d'embryons une multiplicité de débouchés commerciaux. La commercialisation d'embryons, comparée aux échanges d'animaux vivants, apparaît comme un moyen sanitaires satisfaisant et économiquement concurrentiel pour développer des échanges de matériel génétique (BARIL *et al.*, 1993).

### 4.3 Collecte d'embryons

#### 4.3.1 Principe général

Les embryons sont récoltés par « lavages successifs » des deux cornes utérines. Une solution physiologique est injectée à l'une ou l'autre des extrémités de la corne utérine. Le flux créé par l'injection de cette solution entraîne les embryons à l'extrémité opposée de la corne utérine où ils sont récupérés par un cathéter, avec le milieu de collecte (BARIL *et al.*, 1993).

On réalise la collecte des embryons aux environs du sixième jour après le début de l'œstrus pour diverses raisons : le passage des embryons de l'oviducte vers l'utérus se réalise le quatrième jour, la législation impose que l'embryon soit transféré avant sa sortie de la zone pellucide qui peut survenir le huitième jour et, enfin, la congélation des embryons n'est bien maîtrisée que pour les embryons des stades morula compactée et blastocyste soit les sixième et septième jours après l'ovulation.

Le col de l'utérus de la brebis étant difficile à franchir, la collecte des embryons ne peut se faire par les voies génitales naturelles. Elle se réalisera donc soit par laparotomie abdominale (collecte chirurgicale) ou sous contrôle endoscopique (collecte par laparoscopie).

#### 4.3.2 Les différentes méthodes de collecte

En raison de la difficulté de « franchir » le col de l'utérus et de l'impossibilité de manipuler les cornes utérines par palpation rectale comme chez les bovins et équins, la collecte des embryons par les voies génitales naturelles est peu développée chez les petits ruminants. De plus, le taux de récupération des œufs obtenus par cette méthode est en général très faible et inférieur à celui obtenu par laparoscopie ou chirurgie. Chez la brebis, MYLNE *et al.* et COONROD *et al.* ne réussissent à pratiquer cette méthode que chez respectivement 40 à 59 % des femelles, et cela est dû à la difficulté de mettre en place la sonde dans les voies cervicales (MYLNE *et al.*, 199 ; CONROD *et al.*, 1984).

La collecte chirurgicale est réalisée par laparotomie. Elle consiste à extérioriser le système reproducteur de la brebis par une incision dans la paroi abdominale et à rincer successivement les deux cornes utérines avec du milieu tamponné. Cette technique est la méthode de récolte la plus utilisée en raison du taux de collecte élevé observé ; néanmoins, celui-ci diminue lors de la répétition de cette manipulation. En effet, on voit apparaître, suite à l'opération, des adhérences sur l'utérus, les oviductes et les ovaires. Le taux d'embryons collectés est de 70 à 90 % (nombre d'embryons collectés / nombre de corps jaunes x 100) (TORRES *et SEVELLEC*, 1987).

La collecte par endoscopie fut développée afin d'améliorer les possibilités de répétition de la collecte chez les femelles donneuses permanentes (BARIL *et al.*, 1993). Elle est basée sur la même méthode que la collecte chirurgicale, mais est réalisée dans l'abdomen de l'animal grâce à l'observation des viscères par l'endoscope. Cette méthode utilise l'endoscope et la création d'un pneumopéritoine comme lors de l'IAIU. De plus, elle utilise une sonde à trois voies pour réaliser le rinçage des cornes utérines. Le taux de collecte obtenu par endoscopie est 10 à 15 % inférieur à celui obtenu par chirurgie. Toutefois, il n'y pas d'observation de diminution du taux de collecte lors de répétitions de cette procédure (VALLET *et al.*, 1991).

#### 4.4 Conservation des embryons

Un autre intérêt du transfert d'embryons est qu'il est possible de dissocier dans l'espace et dans le temps les techniques de production et de transfert et ce par une méthode de conservation des embryons. Cette conservation peut se faire de deux manières :

- soit par une conservation de courte durée (24 à 48 heures) par simple refroidissement ;
- soit par une conservation à long terme par cryopréservation et stockage dans de l'azote liquide.

#### 4.5 Sélection des embryons

La congélation ne doit être appliquée qu'à des embryons de qualité bonne à excellente. Il apparaît également que les embryons produits *in vivo* et *in vitro* possèdent le même taux de survie et la même compétence de développement après congélation. Cependant, les protocoles de congélation sont légèrement différents selon l'origine des embryons (*in vivo/in vitro*) (DOBINSKY, 2002). Les embryons de qualité inférieure verraient leur espérance de survie considérablement réduite après congélation. Il est conseillé de limiter le temps d'attente des embryons devant être congelés à deux ou trois heures.

Après sélection, l'embryon est placé dans une solution de cryoprotecteur. Les embryons sont passés progressivement et durant 5 à 10 minutes dans 2 à 3 bains de milieu de conservation présentant une concentration croissante en cryoprotecteurs. Ils sont ensuite déposés dans une chambre de congélation où la descente de température est programmée avec précision, puis conservés dans l'azote liquide.

#### 4.6 Induction de l'œstrus et de l'ovulation chez les femelles receveuses

Les receveuses reçoivent également un traitement progestatif identique à celui des donneuses. Lorsque le transfert est pratiqué sans délai, le traitement progestatif des donneuses et des receveuses débute au même moment, afin qu'elles soient au même stade physiologique au moment de la transplantation embryonnaire.

Une injection de PMSG est réalisée à la fin du traitement progestatif lors du retrait de l'éponge vaginale. Les femelles viennent en chaleur en moyenne 36 heures plus tard avec un retard de 12 heures par rapport aux donneuses traitées avec pFSH. Pour mieux synchroniser les stades des donneuses et receveuses, il convient donc d'arrêter le traitement progestatif des receveuses avec une avance de 12 heures par rapport à celui des donneuses (BARIL *et al.*, 1993). En effet, le stade physiologique des donneuses et des receveuses est un facteur important pour la survie des embryons. On a constaté que le taux de gestation diminuait rapidement si la différence du jour du cycle était plus grande que 48 heures chez la brebis (SUGIE *et al.*, 1989).

#### 4.7 Le transfert d'embryons

##### 4.7.1 Facteurs de réussite du transfert

Afin que le transfert se réalise dans les meilleures conditions de survie des embryons, il est nécessaire de respecter quelques facteurs physiologiques qui interviennent dans le taux de réussite du transfert.

Ces facteurs sont :

- **la qualité des embryons.** C'est le principal facteur de réussite. La survie des embryons ne présentant aucun défaut visible est toujours significativement supérieure à celle d'embryons de moindre qualité (BARIL *et al.*, 1993). Néanmoins, il n'y a pas de différence au niveau du taux de survie entre les embryons classés comme ayant une qualité « bonne » et ceux ayant une qualité « excellente » (BARI *et al.*, 2003).
- **le nombre d'embryons transférés.** Le maximum est de 2 embryons par receveuse. Cependant, il fut observé qu'il n'y avait pas d'avantage à transférer deux embryons par rapport à un seul, le pourcentage de survie étant quasiment le même (ARMSTRONG *et EVANS*, 1983).
- **le délai de réalisation de transfert.** Si on transfère les embryons en frais, le délai séparant la collecte de la remise en place chez les receveuses ne devrait pas excéder 2 heures. Pour les embryons cryopréservés, le délai entre décongélation et transfert doit être réduit au minimum, soit environ 20 à 30 minutes.
- **transfert unilatéral ou bilatéral.** Les embryons sont généralement transférés du côté ipsilatéral à l'ovaire présentant le plus grand nombre de corps jaunes fonctionnels. Le site de dépôt des embryons ne semble pas être un facteur majeur du taux de réussite du transfert (SUGIE *et al.*, 1989).
- **la synchronisation donneuses/receveuses.** Meilleure est la synchronisation entre donneuse et receveuse, meilleur est aussi le taux de réussite du transfert.

- **la réponse ovulatoire de la receveuse.** La qualité des corps jaunes doit être prise en compte. Des receveuses présentant des corps jaunes ayant un développement trop tardif sont refusées.

#### **4.7.2 Les méthodes de transfert**

Il existe différentes méthodes de transfert : le transfert chirurgical (laparotomie), le transfert sous contrôle endoscopique, le transfert semi-endoscopique et le transfert par voie cervicale.

Le transfert, dans notre cas, se réalise sous endoscopie.

Ce type de transfert est plus rapide, moins traumatisant et au moins aussi efficace que le transfert par voie chirurgicale. Des résultats de 69% de reprise des embryons après transfert chirurgical sont annoncés contre 74% par voie laparoscopique (*BREBION et al., 1989*).

Le transfert d'embryons réalisé par laparoscopie ou par laparotomie possède la même efficacité soit 70 à 75 % de taux de gestation (*COGNIE et BARIL, 2002*).

## 5 Objectifs de ce mémoire

La race Texel est de loin la plus répandue en Belgique, pays de sélectionneurs. Elle possède une saison de reproduction limitée qui s'étend de la mi-septembre à la fin janvier. Elle est caractérisée par un développement musculaire extraordinaire. On parle du gène « culard » par analogie avec celui de nos bovins « Blanc-Bleu-Belge » bien que chez le mouton aucun gène spécifique n'a pu être mis en relation avec ce caractère (MARCQ ET LEROY, 1997).

Comme chez le Blanc-Bleu, l'hypertrophie musculaire est liée à une diminution des performances de reproduction et à des difficultés lors de la mise bas. L'effort des sélectionneurs se porte donc actuellement sur le caractère viandeux, mais aussi sur une plus grande taille des animaux qui va de pair avec de meilleures aptitudes reproductrices et maternelles.

Le transfert d'embryons est une technique qui permet d'une part d'accélérer l'effort de sélection en multipliant la descendance des femelles d'élite et d'autre part de faciliter l'exportation de ce « matériel génétique ».

L'objectif de ce mémoire a été d'affiner le protocole de superovulation chez la brebis Texel, afin d'obtenir qu'il soit le plus reproductible et le plus efficace possible.

Le protocole de superovulation à base de FSH et LH a été maintenu lors de la première et de la deuxième expérience. Les deux hormones ont été administrées en rapports décroissants comme décrit dans la littérature. Par contre, pour la troisième expérience, ce protocole sera comparé à un nouveau produit, le Stimufol®.

Lors de ce travail, une attention particulière s'est portée sur les agonistes du GnRH. Les agonistes utilisés ont été la Buséréline et le Décapeptyl®. La Buséréline a déjà montré ses effets positifs lors des expériences des années précédentes. Mais, en raison du stress que peut provoquer la pose des pompes osmotiques chez les animaux pour son administration et des manipulations qu'elle impose, il a été décidé de tenter une nouvelle approche. En effet, l'administration de Décapeptyl (agoniste) est réalisée sous forme d'une seule injection intramusculaire, car ce composé est sous forme retard.



## Matériel et Méthode

### 1 Animaux utilisés

#### 1.1 Les brebis donneuses

Les brebis donneuses sont uniquement choisies parmi les brebis Texel de « type hollandais » culard, exactement semblables à celles qui sont susceptibles de participer à cette technique de sélection chez les éleveurs. Afin d'analyser dans le futur la corrélation entre la réponse ovulatoire et l'animal, certaines brebis sont reprises régulièrement dans les expériences successives.

Tableau n° 1 : liste des brebis traitées et leur rôle dans les trois expériences.

<i>exp 1</i>	<i>exp 2</i>	<i>exp 3</i>	<i>N° SANITEL</i>	<i>Rôle dans l'expérience 1</i>	<i>Rôle dans l'expérience 2</i>	<i>Rôle dans l'expérience 3</i>
1	7	3	9004.7261	Témoin	Buséréline	Busé (FSH)
2	1		9008.3312	Témoin	Témoin	-
3	12		9008.3104	Témoin	-	-
4	<b>11</b>		9009.1831	Témoin	Décapeptyl®	-
5	6	1	9008.3319	Témoin	Buséréline	Busé (FSH)
6	<b>3</b>		9004.7283	Buséréline	Témoin	-
7	13	6	9009.1827	Buséréline	Décapeptyl®	Busé (Stimufol)
8	2	5	9008.3303	Buséréline	Témoin	Busé (FSH)
9	4		9008.3102	Buséréline	Témoin	-
10	<u>8</u>		9008.3314	Buséréline	Buséréline	-
11	<b>10</b>	<b>7</b>	9009.1811	Décapeptyl®	Buséréline	Busé (stimufol)
12	15		9008.3346	Décapeptyl®	Décapeptyl®	-
13	5	4	9004.7264	Décapeptyl®	Témoin	Busé (FSH)
14	9	9	9009.1962	Décapeptyl®	Buséréline	Busé (Stimufol)
15	14		9009.1817	Décapeptyl®	Décapeptyl®	-
	<u>18</u>		9009.8848	-	Décapeptyl®	-
		8	9007.9931	-	-	Busé (stimufol)
		10	9003.8826	-	-	Busé (stimufol)
		2	9004.7112	-	-	Busé (FSH)

Cependant, en raison des adhérences apparues chez certaines brebis utilisées dans plusieurs essais, il s'est avéré nécessaire de renouveler progressivement le lot des brebis donneuses..

La brebis n° 12 a été réformée car elle présentait trop d'adhérences. Elle a été remplacée par une agnelle portant le n°18.

Les brebis **3**, **10** et **11** ont des adhérences, ce qui a parfois rendu la visibilité faible lors des endoscopies. Les brebis 3 et 8 ont connu également des problèmes qui les rendaient inaptes à la production d'embryons.

#### 1.2 Les brebis receveuses

Les brebis receveuses sont des croisées entre des Béliers de race Laitier Frison et des brebis de race Suffolk issues du CRO à Faux-Les-Tombes. Elles ont été choisies pour leur bonne fécondité naturelle, leur aptitude laitière et leur phénotype fort différent des Texel.

Le tableau n° 2 présentent les numéros SANITEL des receveuses utilisées lors de l'expérience de Février 2005.

*Tableau n° 2 : liste des receveuses de Février 2005*

4.7162	4.7149°	4.7297*
4.7199*	8.3287*	8.3090*
4.7193*	4.7285*	8.3119°
	4.7205*	9.1803* °

Les receveuses de septembre 2004 portent un ° et celles de mai 2005 ayant été utilisées précédemment portent un \*.

### **1.3 Produits utilisés**

Le tableau n° 3, en annexe, reprend les produits utilisés, leur rôle et les quantités administrées.

## **2 Plan expérimental**

### **2.1 Objectifs des différentes expériences**

Trois expériences ont été réalisées en vue d'atteindre les objectifs suivants :

- inhiber des sécrétions hypophysaires de LH et FSH ;
- empêcher dès lors la croissance folliculaire terminale, ce qui devrait se traduire par l'accumulation de petits follicules (PF) ;
- stimuler massivement la croissance de tous ces PF afin d'induire le développement d'un grand nombre de follicules préovulatoires, puis un taux d'ovulation très important et enfin la production d'un grand nombre d'embryons

La première expérience a été réalisée en saison de reproduction, c'est-à-dire en septembre 2004. Elle a permis de comparer l'effet de la Buséréline (100 µg/ jour pendant 14 jours) à celui du Décapeptyl (3 mg) sur le blocage hypophysaire.

Au vu des résultats obtenus lors de la première expérience, une deuxième expérience a été réalisée. Elle s'est déroulée en début d'anœstrus, en février 2005. Le protocole utilisé était le même que lors de l'expérience de septembre ; cependant, les doses utilisées ont été modifiées : 40 µg/jour pour la Buséréline et 2x1mg à une semaine d'intervalle pour le Décapeptyl.

Une troisième expérience fut mise sur pied en mai 2005 en anœstrus profond. Le blocage hypophysaire a été de nouveau la cible de nos recherches, ainsi que la stimulation ovarienne. Le blocage a été réalisé avec de la Buséréline à raison de 140 µg/jour. Quant à la stimulation ovarienne, elle a fait l'objet d'une comparaison entre le protocole classique FSH-LH et l'utilisation du Stimufol-LH.

Au terme de ces trois expériences, des analyses ont été réalisées : dosage des taux plasmatiques de FSH et LH, analyse des populations folliculaires aux différents stades du traitement, du taux d'ovulation et du taux de récolte des embryons s'il y a eu fécondation.

#### **2.1.1 Expérience n° 1**

##### **2.1.1.1 Décapeptyl vs Buséréline**

Pour que le traitement à base de Buséréline soit efficace, il faut que son administration soit continue ; d'où l'utilisation de pompes osmotiques ALZET. Cependant, la pose et le retrait

des pompes nécessitent à chaque fois une intervention chirurgicale, qui peut être un facteur de stress pour les animaux.

Le Décapeptyl® a été choisi en raison de sa facilité d'utilisation. Ce composé ne nécessite pas la pose des pompes. Une seule injection est requise, car le produit est sous forme « retard ».

#### **2.1.1.2 Protocole expérimental**

Les brebis ont été réparties en trois groupes de 5 : groupe Témoin, groupe Buséréline et groupe Décapeptyl®. Une endoscopie est réalisée avant le début de traitement afin d'évaluer la population folliculaire de départ.

Le groupe Buséréline reçoit la Buséréline grâce à la pose des pompes osmotiques ALZET 2ML2 en sous-cutané au niveau de la nuque. Ces pompes sont remplies d'une solution de SUPREFACT® diluée de façon à ce qu'elles libèrent 100 µg de Buséréline par jour. Lors de la pose, on réalise une injection de 100 µg de SUPREFACT®. Comme les pompes diffusent pendant 14 jours et que nous avons besoin de 100µg/jour de Buséréline, 1400 µg de l'agoniste sont nécessaires par pompe de 2 ml. Les pompes doivent donc contenir une solution de Buséréline à 0,7 mg/ml : 7 ml de SUPREFACT® sont à cet effet dilués dans 3 ml d'eau distillée. Les pompes sont ensuite remplies (figure 9) à l'aide d'une seringue prévue à cet effet, ensuite elles passent la nuit dans une solution saline 0,9 % à 37 °C la veille de leur pose.

Le groupe Décapeptyl® reçoit une injection de 3,75 mg en intramusculaire.

Le traitement superovulatoire à base de FSH et LH commence le lendemain de l'arrêt du traitement avec la Buséréline. À ce moment, l'hypophyse doit être bloquée et les taux de FSH et LH endogènes devraient être minimales.

Le traitement consiste en huit injections intramusculaires de FSH à 12 heures d'intervalle. Ce traitement est administré pendant 4 jours, en doses décroissantes.

La FSH a pour rôle de stimuler la croissance folliculaire et de préparer l'action de la LH. Les quantités de FSH administrées sont souvent exprimées en unité Armour. L'unité Armour est une unité d'activité d'un test biologique correspondant à environ 10-14µg d'hormone FSH pure. En raison de la courte demi-vie de la FSH (3-4 heures), il est nécessaire de répartir la dose en plusieurs injections pour induire la superovulation.

La FSH est administrée selon le protocole suivant : 6UA matin et soir le premier jour du traitement superovulatoire ; 5UA le deuxième jour ; 3UA, le troisième jour ; 2UA, le quatrième jour.

La LH est administrée le dernier jour du traitement avec la FSH. Elle est injectée en doses croissantes. On injecte 0,06 mg de LH au matin et 0,09 mg le soir avec la FSH. Le lendemain, on injecte 3 ml de LH en intraveineux, 32 heures après le retrait des éponges de progestagènes.

Une endoscopie est réalisée l'avant-veille du début du traitement superovulatoire, afin d'observer si le blocage hypophysaire a fonctionné.

À la fin du traitement superovulatoire, les brebis sont inséminées par insémination intra-utérine (IAIU). Cette insémination est réalisée 20 heures après la dernière injection de LH.

Après l'IAIU, le groupe Décapeptyl reçoit des nouvelles éponges de P4, elles resteront en place jusqu'au jour de la collecte. Le Décapeptyl bloque l'hypophyse pendant plus ou moins un mois : or, pour notre expérience, on a besoin que de 15 jours de blocage ; c'est pourquoi, après l'insémination artificielle, il est nécessaire de reposer des éponges afin de créer un corps jaune artificiel.

Six jours après l'insémination, les corps jaunes sont dénombrés, les embryons récoltés et transférés chez les donneuses.

Enfin, des prises de sang régulières sont réalisées afin de suivre l'évolution des taux plasmatiques de FSH et LH tout au long du traitement.

Les receveuses reçoivent uniquement un traitement de synchronisation de l'œstrus à base de progestagènes. On leur pose les éponges vaginales VERAMIX® le jour 8. Le retrait des éponges s'opère le jour 22 et, en même temps ; les brebis reçoivent une injection de PMSG (Folli-gon®) à raison de 666 UI par animal (Tableau 4).

### **2.1.2 Expérience n° 2**

Les brebis sont également réparties en trois groupes : Témoins, Buséréline et Décapeptyl (tableau 5).

Cette expérience est semblable à la première, si ce n'est qu'elle diffère par les doses appliquées. La Buséréline est administrée à raison de 40µg/jour pendant 14 jours. Comme les pompes diffusent pendant 14 jours et que nous avons besoin de 40µg/jour de Buséréline, 560 µg de l'agoniste sont nécessaires par pompe de 2 ml. Les pompes doivent donc contenir une solution de Buséréline à 0,3 mg/ml : 3 ml de Suprefact® sont à cet effet dilués dans 7 ml d'eau distillée.

Le Décapeptyl® est injecté en deux fois (2 mg au total) ; la deuxième injection se fait 10 jours après la première.

Les traitements hormonaux de stimulation ovarienne sont les mêmes que pour l'expérience précédente.

### **2.1.3 Expérience n° 3**

La troisième expérience s'est déroulée du 9 mai au 8 juin 2005. Seulement deux groupes de cinq brebis ont été utilisés. Les donneuses ont été réparties en deux groupes :

- Le premier groupe est composé des cinq premières brebis. Celles-ci reçoivent par pompe osmotique 140 µg de Buséréline par jour, pendant 14 jours. La stimulation ovarienne suit le protocole FSH/LH habituel.
- Le deuxième groupe est composé des brebis 6 à 10 ; elles reçoivent la même quantité de Buséréline. Par contre, le protocole de stimulation ovarienne est à base de Stimufol®.

Pour obtenir une libération quotidienne de 140 µg de Buséréline par jour, les pompes osmotiques ont été remplies avec 2 ml de Suprefact® pur. De même que pour les expériences précédentes, 100 µg d'agoniste ont été injectés à chaque animal lors de la pose des pompes.

Ce protocole avait déjà été testé lors de l'expérience de mai 2004. Il avait donné de bons résultats au niveau de la population des PF ; cependant, la stimulation ovarienne par FSH/LH n'avait pas fonctionné. C'est pourquoi, le deuxième groupe traité a été stimulé à l'aide de Stimufol®. Le stimufol est un mélange de pFSH (80%) et pLH (20%) utilisé pour induire l'ovulation chez les bovins. Il est administré comme la FSH en doses décroissantes ; on administre au total 6,4 ml répartis comme suit :

Doses (ml)	Timing	Jours
1,2	matin et soir	18
1,0	idem	19
0,6	idem	20
0,4	idem	21

De plus, le premier jour de la stimulation ovarienne, les deux groupes ont reçu une dose de 0,475 ml d'Estrumate® qui est une solution de PGF<sub>2α</sub> synthétique qui va permettre l'élimination des CJ résiduels éventuels. Le reste des traitements hormonaux est semblable aux deux autres expériences (tableau 6).

### 3 Manipulations des animaux

#### 3.1 Prises de sang

Les brebis sont immobilisées et un garrot leur est appliqué à la base du cou. La prise de sang se réalise dans la veine jugulaire à l'aide d'une aiguille stérile. Le sang est récupéré dans un tube à essai contenant 3 gouttes d'héparine afin d'éviter la coagulation. Les différents tubes sont alors placés dans une centrifugeuse pendant 15 minutes à 3 000 tours/minutes. Le plasma peut ensuite être récupéré et conservé dans de nouveaux tubes à -20°C.

#### 3.2 Pose des pompes osmotiques

Les pompes osmotiques ALZET® sont placées sous la peau au niveau de la nuque et des épaules. Pour ce faire, une incision d'environ 4 cm est pratiquée au bistouri après anesthésie locale à la lignocaïne, puis le conjonctif lâche sous-cutané est déchiré à l'aide de ciseaux à pointes mousses, permettant l'introduction de la pompe. La plaie est suturée et ensuite pulvérisée de Cyclospray. Le retrait de la pompe suit le même protocole.

#### 3.3 Pose des éponges

La vulve de la brebis est lavée à l'aide d'un désinfectant et l'éponge est placée à l'aide d'un applicateur en plastique jusqu'au fond du vagin. À l'aide du poussoir, on pousse l'éponge au fond du vagin ; ensuite, on retire l'applicateur et le poussoir. Entre chaque brebis traitée, il est nécessaire de désinfecter l'applicateur à l'aide d'une solution à base d'hibitane ; de plus, on étend sur l'applicateur une crème antiseptique qui servira également de lubrifiant (crème VERAMIX®). Pour retirer l'éponge, il suffit de tirer doucement sur la ficelle qui sort de la vulve, ficelle à laquelle est attachée l'éponge.

#### 3.4 Observation des ovaires

Les ovaires sont observés par laparoscopie aux moments clés des traitements :

1. en début d'expérience avant le traitement de blocage hypophysaire ;
2. à la fin du blocage hypophysaire ;
3. après le traitement de stimulation superovulatoire au moment de l'IA ;
4. et lors de la collecte des embryons afin de dénombrer les corps jaunes (CJ) témoins des ovulations.

Les brebis sont mises à jeun 24 heures avant l'endoscopie afin de réduire le volume du rumen et faciliter la visualisation du tractus génital.

Elles sont placées en décubitus dorsal sur la table de contention et la paroi abdominale est tondu, lavée et désinfectée. Des anesthésies locales sont effectuées à l'aide d'1 ml de ligno-

caïne aux endroits d'application des trocars puis l'arrière-train de la brebis est soulevé de manière à atteindre une inclinaison de 40° de l'animal, ce qui déplace les viscères du système digestif vers le diaphragme et met en évidence le système reproducteur.

Un trocart de 5 mm de diamètre est introduit avec sa canule à 10 cm en avant du pis et 5 cm à droite de la ligne blanche. Cette canule est reliée à l'insufflateur automatique de CO<sub>2</sub> qui maintient dans la cavité abdominale une pression de 10 cm Hg suffisante pour bien séparer les organes de la paroi ; elle permettra le passage d'une pince atraumatique utilisée pour manipuler les ovaires.

Un trocart de 10 mm est inséré de façon symétrique par rapport à la ligne blanche. Sa canule permet le passage de l'endoscope. Celui-ci est relié à une source de lumière froide qui permet d'éclairer les viscères ; grâce à un second faisceau de fibres de verre, l'observation de ces viscères peut-être réalisé. Une caméra miniature est fixée sur l'oculaire et permet à toute l'équipe d'observer le travail et d'y participer via un moniteur TV (figure 10).

Après l'observation, les instruments sont retirés des canules, la pression abdominale est réduite par échappement du CO<sub>2</sub>, puis les canules sont retirées et les petites entailles suturées à l'aide d'une agrafe de Michel 10 mm et désinfectées avec un antiseptique en spray.

La brebis reçoit une injection d'antibiotique (Penistrep-Kel ; 1 ml/25 kg) puis est reconduite dans l'enclos.

### **3.5 Insémination**

#### **3.5.1 Récolte du sperme**

La récolte de sperme se réalise grâce à la technique du vagin artificiel. Cette technique est utilisée sur des béliers du Centre d'Insémination et de Sélection Ovine (CISO) situé à Faux-Les-Tombes. Le bélier choisi est mis en présence d'une brebis en chaleur et, lors du saut, le sperme est récolté dans le vagin artificiel. Le sperme est analysé (motilité massale, concentration, etc.). Il est ensuite dilué dans un milieu spécial (Ovidil®) afin d'obtenir une concentration de 100.10<sup>6</sup> spermatozoïdes/paillette de 250 µl et maintenu à une température de 30 °C, depuis les analyses jusqu'au moment des inséminations.

#### **3.5.2 Insémination intra-utérine**

L'insémination artificielle intra-utérine (IAIU) est réalisée par laparoscopie comme lors des observations des ovaires. La pince atraumatique est remplacée par un pistolet d'insémination qui permet de manipuler les organes. La gaine « Aspic », qui possède une petite aiguille terminale, permet d'injecter le contenu de la paillette en doses égales dans chacune des cornes utérines.

### **3.6 Collecte d'embryons**

#### **3.6.1 Collecte par laparoscopie**

La brebis est d'abord soumise à une laparoscopie classique pour observer les ovaires. Sous contrôle endoscopique, la base d'une corne utérine est saisie fermement par la pince atraumatique et un petit trou y est réalisé grâce au troisième trocart. La troisième canule (5 mm) placée au niveau de la ligne blanche et à 15 cm de l'attache de la mamelle permet le passage d'un cathéter à ballonnet dont l'extrémité est introduite au lieu de ponction dans la lumière utérine.

Pour obstruer la lumière utérine à la base de la corne, le ballonnet fixé sur la sonde est gonflé d'air à l'aide d'une seringue. Du liquide de collecte embryonnaire (PBS) est injecté et récupéré.

ré à plusieurs reprises dans la corne, puis l'opération est réalisée avec la seconde corne utérine.

Une fois le lavage des deux cornes réalisé, on retire les instruments de la cavité abdominale. Les trous laissés dans la peau sont suturés à l'aide d'agrafes et vaporisés avec du spray antiseptique.

### **3.6.2 Recherche des embryons**

Les différentes fractions de la récolte sont mises dans une boîte de pétri et observées au bino-culaire. Le fond de cette boîte est quadrillé de manière à rendre plus facile la recherche des embryons. Dès qu'un embryon est repéré, il est aspiré à l'aide d'une unopette (petit capillaire inséré au bout d'une seringue à tuberculine) avec un volume le plus faible possible du tampon PBS.

Il est ensuite placé dans un bain d'ECM qui est un milieu nutritif pour les embryons. Les embryons sont généralement transférés par deux pour une receveuse. La préparation de ces milieux (PBS et ECM) se trouve décrite en annexe au point C.

### **3.6.3 Conservation des embryons - Vitrification**

Bien que la plupart des embryons aient été transférés en frais, certains furent congelés selon la méthode de vitrification. Cette méthode ne nécessite pas de matériel perfectionné ni d'un temps de travail élevé. Les embryons sont déposés par 2 dans un bain de ECM à 25% glycérol + 25% d'éthylène glycol pendant maximum 30 secondes. On aspire les 2 embryons avec quelques microlitres de milieu. Le tout est déposé au fond d'un puits et aspiré par capillarité dans une paillette capillaire (paillette OPS étirée). La paillette est directement plongée dans l'azote liquide sans être bouchée. Cette méthode permet un refroidissement plus rapide que par la méthode avec des paillettes classiques. Pour les décongeler, les paillettes seront simplement agitées dans l'air pendant quelques secondes.

## **3.7 Transfert des embryons**

La méthode de transfert utilisée est semi-endoscopique.

La brebis receveuse est positionnée en décubitus dorsal sur la table de contention. Ensuite, le champ opératoire est préparé comme indiqué supra. Les brebis sont anesthésiées localement à l'aide de Xylocaïne. L'endoscope et la pince atraumatique sont insérés de la même manière que pour une endoscopie.

L'opérateur visualise les ovaires et recherche la corne utérine ipsi-latérale par rapport au corps jaune. Il retire alors la canule et agrandit l'entaille sur 1 cm puis réintroduit la pince. La corne de transfert choisie est alors saisie à proximité de la jonction utéro-tubaire. L'extrémité de la corne est extériorisée sur une longueur d'environ deux cm. Après préhension de la corne avec les doigts, l'opérateur réalise alors un trou dans la corne à l'aide d'une aiguille de seringue. Les embryons sont déposés dans le délai le plus court dans la lumière utérine via une micro-pipette. Les embryons y avaient été aspirés au préalable avec un peu de PBS (figure 11).

La corne est alors replacée dans l'abdomen. Les incisions sont suturées à l'aide d'agrafes et un antiseptique en spray est pulvérisé. Il est également nécessaire d'administrer l'antibiotique référencé après chaque transfert.

## 4 Dosage radioimmunologique (RIA)

### 4.1 Principe du dosage

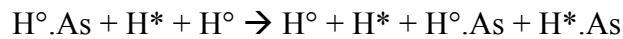
Ce dosage est réalisé sur les plasmas issus des prises de sang réalisées tout au long de l'expérience.

Le principe de ce dosage repose sur la compétition entre une hormone à analyser ( $H^{\circ}$ ) et une quantité connue d'hormone marquée ( $H^*$ ) pour la fixation sur un antisérum spécifique.

La quantité d'antisérum (As) est connue et est mélangée avec l'hormone à analyser.



On ajoute l'hormone marquée ( $H^*$ ):



Après équilibre, on se retrouve avec une hormone sous deux formes :

- $H^{\circ} + H^*$  est la fraction libre et
- $H^{\circ}.As + H^*.As$  est la fraction liée à l'anticorps.

Pour séparer les deux fractions, on utilise la technique du double anticorps. Il s'agit de précipiter le complexe hormone-anticorps par la fixation sur des antigammaglobulines de lapin (ARGG) qui est le deuxième anticorps.

Avec des solutions de concentrations connues, on peut réaliser une courbe d'étalonnage. On compare, ensuite, les résultats obtenus pour l'hormone à tester avec la courbe standard. Cela permet de déterminer la concentration en hormones du plasma. Pour le calcul des valeurs, les points de la courbe standard sont introduits dans un logiciel de fitting (MATLAB R12) qui calcule les paramètres de la formule correspondant à un équilibre entre deux hormones ( $H^{\circ}$  et  $H^*$ ) pour leur fixation sur un antisérum spécifique, son équation est :

$$A = A_o (C_m / (C_m + C_f)) + BG$$

A : radioactivité mesurée de la phase liée

A<sub>o</sub> : radioactivité lorsque la concentration en hormone froide est nulle

C<sub>m</sub> : concentration en hormone marquée

C<sub>f</sub> : concentration en hormone froide

BG : radioactivité non spécifique

### 4.2 Protocole des dosages FSH et LH

#### 4.2.1 Protocole pour le dosage de la FSH

Les manipulations pour le dosage RIA de la FSH sont les suivantes : 50 µl de plasma sont additionnés de 50 µl d'anticorps spécifiques, appelé As FSH (n° NIAmDD.NIH, AFP-



C5288113). Après 4 heures d'incubation à température ambiante, on ajoute 50 µl de FSH marquée (20 000 cpm). Le tout est vortexé et mis à incuber pendant une nuit entière à température ambiante. Ensuite, 250 µl du deuxième anticorps (ARGG) sont ajoutés au mélange. Cet anticorps est contenu dans une solution tampon à base de PEG et de cellulose. La solution obtenue est vortexée. Après 4 heures, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 3 000 tours/minutes. Le surnageant est éliminé à la trompe à vide et le culot est resuspendu dans du tampon phosphate puis recentrifugé. Après élimination du surnageant, le culot est passé dans un compteur gamma pendant 1 minute.

Une courbe standard allant de 0 à 50 ng/ml est réalisée à l'aide d'oFSH (NIH NIAmDD-oFSH-RP-1).

Tous les dosages sont réalisés en duplicata pour les plasmas et en triplicata pour les standards.

La FSH utilisée pour le marquage a comme référence NIAmDD-oFSH-I-1 (AFP-5679 C) et celle utilisée pour les standards NIH NIAmDD-oFSH-RP-1.

La sensibilité du dosage est de 0,06 ng/ml, ses coefficients de variation intra et inter essai sont respectivement de 4,97 % et 10,8 %. Les valeurs de spécificité du test sont : oLH <0,2 %, oGH <0,03 % et oPRL <0,001 %.

Les tableaux 7 à 9 (en Annexes) reprennent les solutions utilisées pour le dosage RIA de la FSH.

#### **4.2.1.1 Protocole pour le dosage de la LH**

Le protocole de dosage de la LH est identique à celui de la FSH, si ce n'est que l'on utilise un anticorps spécifique de la LH. La référence de celui-ci est : NIADDK-anti oLH (AFP-192279).

La LH utilisée a pour référence : NIADDK-oLH-I-3 (AFP-9598 B).

La sensibilité du dosage est de 0,07 ng/ml, ses coefficients de variation intra et inter essai sont respectivement de 6,94 % et 11,21 %. Les valeurs de spécificité du test sont : oFSH <5 %, oGH <0,6 %, oTSH <1,5 % et oPRL <0,005 %.

Les solutions utilisées pour ce dosage sont reprises dans les tableaux 11 à 14 (en annexes)

## **5 Analyses statistiques**

L'étude statistique des résultats a été réalisée par l'ANOVA (Analyse de variance à un facteur). Pour les études de corrélation entre deux facteurs, le test de Student a été employé.

## RESULTATS

Les trois expériences ont été conduites avec les objectifs suivants :

- a. obtenir, après blocage hypophysaire, une population plus importante de petits follicules ;
- b. recruter, grâce à une stimulation ovarienne à l'aide de FSH et de LH, ces petits follicules et obtenir ainsi un grand nombre de follicules préovulatoires, puis d'ovulations ;
- c. obtenir, après IAIU, un grand nombre d'embryons transférables.

Les termes suivants vont être utilisés : petits follicules (PF), gros follicules (GF), gros follicules préovulatoires (GFPO) et corps jaunes (CJ). Ces termes font référence à des classes bien déterminées de follicules :

- PF : diamètre inférieur à 4 mm
- GF : diamètre supérieur ou égal à 4mm
- GFPO : diamètre supérieur ou égal à 6 mm
- CJ : corps jaune à la surface de l'ovaire sans tenir compte des corpus albicans (CA).

Le blocage hypophysaire, que ce soit avec la Buséréline ou avec le Décapeptyl, a pour but d'augmenter la population de PF et de diminuer celle de GF, ceci étant permis grâce à la désensibilisation de l'hypophyse et donc à la réduction des taux plasmatiques endogènes de FSH et de LH. La réussite de ce blocage sera donc étudié à deux niveaux : au niveau ovarien (populations folliculaires) et au niveau sanguin (taux plasmatiques de FSH et LH).

## 1 Résultats de l'expérience de septembre 2004

### 1.1 Résultats du blocage hypophysaire

Pour rappel, la figure 12 illustre le protocole expérimental appliqué à l'expérience de septembre.

#### 1.1.1 Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH

##### 1.1.1.1 LH

La figure 13 montre l'évolution de la concentration en LH plasmatique pour le lot Buséréline, le lot Témoin et le lot Décapeptyl<sup>1</sup>. Pour la LH, les profils moyens ne montrent aucune différence entre les lots. Quelques valeurs plus élevées sont dues à des individus chez lesquels la prise de sang a probablement été réalisée au cours d'un pulse de sécrétion, notamment en début d'essai dans le lot témoin et au cours des traitements aux agonistes dans les autres lots. Chez 1 brebis Témoin et 2 brebis Décapeptyl, on observe un pic de sécrétion de LH un ou deux jours avant la décharge induite par l'administration de LH exogène, et, dans ce dernier lot, les taux de LH ont déjà augmenté chez toutes les autres brebis. Par contre, le taux de LH reste basal chez les brebis Buséréline. Avant et pendant les traitements aux agonistes, les taux de LH ne diffèrent pas significativement entre les lots ni entre les périodes. Les résultats relatifs aux concentrations hormonales sont basés sur des prises de sang uniques réalisées à différents moments du protocole. Il n'est donc pas question pour la LH d'analyser un effet du blocage sur la pulsativité de cette hormone. Les moyennes seront relatives le plus souvent à une sécrétion de base.

##### 1.1.1.2 FSH

La figure 14 montre l'évolution de la concentration en FSH plasmatique pour le lot Buséréline, le lot Témoin et le lot Décapeptyl<sup>2</sup>.

Le profil moyen de sécrétion pour le groupe Témoin montre des fluctuations entre 1,5 et 2,5 ng/ml. Pour les deux autres lots traités avec des agonistes, les teneurs plasmatiques de départ sont semblables, puis diminuent progressivement pour atteindre, pendant le traitement, des valeurs proches de 0,5 ng/ml, soit 1/3 des valeurs de départ.

Une comparaison statistique a été réalisée afin de comparer le taux de FSH présent avant le début du traitement pour chacun des trois lots avec celui obtenu pendant l'effet maximum supposé du traitement. Ces taux ont été calculés en réalisant la moyenne de 2 prises de sang avant et pendant le traitement, pour tous les animaux de l'expérience (figure 15).

Le groupe Buséréline présente une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) du taux de FSH. Pour le groupe Décapeptyl, on observe une diminution significative ( $P < 0,05$ ) des taux plasmatiques de FSH. Le groupe Témoin présente un taux de FSH qui reste constant.

Les groupes traités ne présentent pas de différence significative du taux de FSH entre eux. On peut observer néanmoins que l'inhibition des taux endogènes de FSH se fait plus rapidement dans le lot Décapeptyl que dans celui traité à la Buséréline. En effet, le 4<sup>e</sup> jour de traitement,

---

<sup>1</sup> La figure 13B, en annexe, reprend les profils individuels de chaque brebis.

<sup>2</sup> La figure 14B, en annexe, reprend les profils individuels de chaque brebis.

toutes les brebis Décapeptyl ont un taux inférieur à 0,8 ng/ml alors que 2 des brebis Buséréline ont encore un taux supérieur à 1 ng/ml.

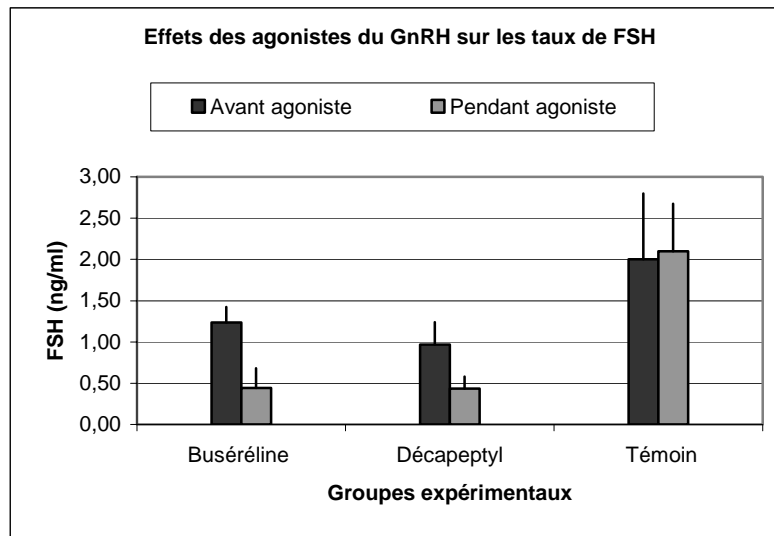


Figure 15 : histogramme des effets des agonistes sur la FSH (septembre 2004)

### 1.1.2 Les populations folliculaires

Après blocage, les résultats obtenus (tableau 17) montrent une augmentation du nombre des PF et une diminution des GF. Les résultats sont repris sous forme d'histogramme à la figure 16.

Tableau n° 17 : nombre de follicules après blocage hypophysaire (septembre 2004)

		Témoin	Buséréline	Décapeptyl
Avant blocage	PF	16,6 ± 5,9	26,2 ± 11,3	18,2 ± 6,8
	GF	3,2 ± 1,8	2,8 ± 2,8	3,8 ± 2,4
Après blocage	PF	15,2 ± 8,5 <sup>a</sup>	38,3 ± 14,7 <sup>b</sup>	27,8 ± 7,6 <sup>ab</sup>
	GF	5,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Chez les brebis du groupe Témoin, qui n'avaient reçu d'autre traitement qu'une éponge de progestagène, le nombre de PF et de GF à la surface de l'ovaire n'a connu aucune modification.

Le groupe traité avec de la Buséréline présente une moyenne de 26,2 PF avant le blocage hypophysaire et 38,3 PF après celui-ci. Les brebis de lot traité à la Buséréline possèdent un nombre de PF significativement plus élevé que les brebis du lot Témoin après le traitement au GnRH. La moyenne de 38,3 a été calculée en enlevant la brebis 9 qui a connu un problème et ne présentait aucun follicules visible à la surface des ovaires. Si l'on tient compte de cette brebis, la moyenne passe de 38,3 à 30,6 ; elle devient alors semblable aux deux autres groupes traités. L'analyse statistique des PF révèle qu'il n'y a pas d'augmentation significative (P>0,05) du nombre de PF avant et après blocage. La population de GF diminue suite au blo-

cage et passe de 2,8 GF en moyenne à 0,2 GF, ce qui revient à dire qu'une seule brebis avait un GF. Cette diminution des GF tend à être significative ( $P = 0,072$ ).

Le groupe traité au Décapeptyl présente une augmentation des PF qui a tendance à être significative ( $P = 0,068$ ). Il passe de 18,2 PF à 27,8 PF. En ce qui concerne la population de GF, on observe une diminution hautement significative des GF suite au blocage hypophysaire ( $P < 0,01$ ). La comparaison des populations des PF et GF avec le groupe Témoin montre qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ).

### 1.1.3 Analyse

Il est intéressant de mettre en relation le nombre de PF présents avant la première injection de FSH (lors de la deuxième endoscopie) et le taux de FSH observé des jours + 4 à + 12 c'est à dire pendant la période où le blocage hypophysaire est effectif chez les animaux traités aux GnRH $\alpha$ .

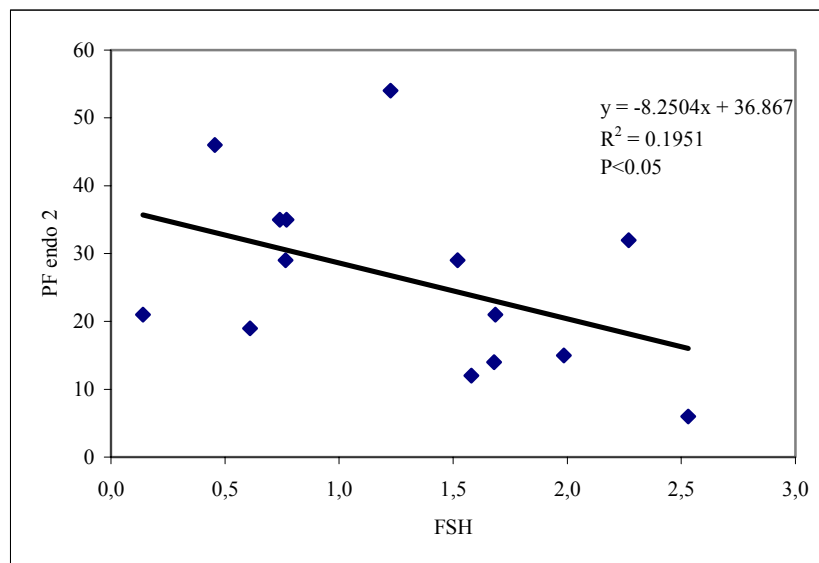


Figure 17 : relation entre le nombre de PF lors de la deuxième endoscopie et les taux sanguins de FSH à la fin du traitement au GnRH $\alpha$  (septembre 2004)

On observe une corrélation négative ( $r = -0,44$ ) entre le nombre des PF lors de l'endoscopie 2 et le taux de FSH pendant le blocage hypophysaire. En inhibant la libération de FSH, les agonistes du GnRH sont donc capables de modifier la population folliculaire dans le sens recherché.

## 1.2 Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH

Après la stimulation ovarienne, une endoscopie est réalisée de manière à compter les GF. C'est à ce moment que le choix d'inséminer la brebis va être pris ou rejeté. Les GF sont les seuls susceptibles d'atteindre l'ovulation et d'aboutir à la production de zygotes lors de l'IAIU.

### 1.2.1 Injections de pFSH et pLH

Les trois groupes ont reçu l'injection de pLH destinée à déclencher l'ovulation le 12 octobre 2004 à 16 heures. Un pic de LH est observé lors de la prise de sang du lendemain matin pour tous les groupes. L'hormone est donc bien arrivée dans le compartiment sanguin des animaux. Par contre, pour le groupe Décapeptyl, on remarque qu'il y a aussi une élévation de LH qui se situe le jour précédant l'injection de pLH chez tous les animaux. Les erreurs de dosage

ayant été écartées, on peut supposer que le blocage hypophysaire par le Décapeptyl ne se serait pas prolongé et ainsi aurait permis une décharge endogène de LH. Ce phénomène est observé chez une brebis Témoin (figure 13).

Les trois groupes présentent une hausse des taux de FSH lors des injections de pFSH. L'hormone a donc bien été assimilée par chaque animal (figure 14).

### 1.2.2 Population folliculaire

La stimulation ovarienne aux gonadotrophines avait pour but de recruter une majorité de petits follicules afin de les mener à un stade pré-ovulatoire. Au terme de ce traitement, on s'attend à une diminution de la population de petits follicules et à une augmentation de celle des gros follicules (tableau 18). La figure 18 montre l'évolution du nombre de GF suite à la stimulation ovarienne.

*Tableau 18 : Population folliculaire après stimulation ovarienne (septembre 2004)*

		Témoin	Buséréline	Décapeptyl
<b>Avant Stimulation</b>	<i>PF</i>	15,2 ± 8,5 <sup>a</sup>	38,3 ± 14,7 <sup>b</sup>	27,8 ± 7,6 <sup>ba</sup>
	<i>GF</i>	5,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
<b>Après stimulation</b>	<i>PF</i>	7,0 ± 6,4 <sup>b</sup>	6,4 ± 3,5 <sup>b</sup>	15,4 ± 3,8 <sup>a</sup>
	<i>GF</i>	6,2 ± 3,6 <sup>b</sup>	15,2 ± 6,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 3,1 <sup>b</sup>

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Au cours de cette expérience, la stimulation ovarienne ne semble pas avoir eu d'effet sur les brebis du lot Témoin. Le nombre des PF a diminué, mais celui des GF n'a pas augmenté de manière significative.

Dans le groupe Buséréline, l'analyse statistique a montré qu'il y avait, après stimulation ovarienne, une diminution significative des PF (P<0,05) et une augmentation hautement significative des GF (P<0,01). Les brebis de ce groupe traité présentaient une variabilité individuelle moins élevée que le groupe témoin. Les brebis Buséréline portaient 10 à 24 GF tandis que les brebis Témoin en portaient de 3 à 12. Plus aucun CJ n'était présent en surface de l'ovaire. Le nombre de gros follicules est significativement (P<0,05) plus élevé dans le groupe Buséréline.

Dans le groupe Décapeptyl, l'analyse statistique a montré qu'il y avait, après stimulation ovarienne, une diminution significative des PF (P<0,05) et une augmentation significative des GF (P<0,05). Les brebis Décapeptyl présentaient beaucoup moins de GF que celles des autres groupes (1 à 9 GF). Mais les moyennes calculées pour ce groupe ne diffèrent pas significativement de celles du lot Témoin. Aucune brebis ne possédait de corps jaune.

### 1.2.3 Analyse

L'augmentation des GF suite au traitement FSH/LH est à mettre en corrélation avec le pool de PF obtenus après blocage hypophysaire (tableau 19), afin de confirmer que les PF que l'on tente d'accumuler possèdent bien la capacité d'évoluer par après.

Tableau 19 : PF recrutables et recrutés lors de la stimulation ovarienne (septembre 2004)

	Témoin	Buséréline	Décapeptyl
<b>PF recrutables</b>	15,2 ± 8,5 <sup>a</sup>	38,3 ± 14,7 <sup>ab</sup>	27,8 ± 7,6 <sup>b</sup>
<b>GF recrutés</b>	6,2 ± 3,6 <sup>b</sup>	15,2 ± 6,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 3,1 <sup>b</sup>
<b>(%)</b>			
<b>Recrutement</b>	41	36	13

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Le taux de recrutement observé chez les brebis traitées à la Buséréline ne diffère pas de celui qui a été calculé pour les brebis Témoin. Il ne semble donc pas qu'il y ait eu une perte de capacité de croissance. Par contre le pourcentage des PF qui ont pu évoluer en GF dans le lot Décapeptyl est très faible et laisse suspecter un effet négatif direct de l'agoniste sur les follicules ovariens.

L'étude statistique montre qu'il existe une corrélation positive ( $r = 0,54$ ) significative ( $P < 0,05$ ) entre le nombre de PF après blocage hypophysaire et le nombre de GF après stimulation FSH/LH, même si on met ensemble les brebis des trois lots.

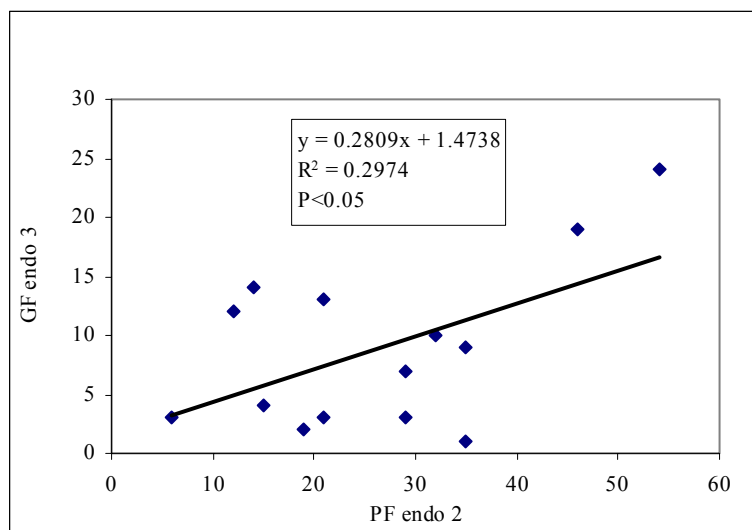


Figure 19 : Relation entre le nombre de PF avant la stimulation ovarienne et le nombre de GF après cette stimulation

Le nombre total des gros follicules après traitement FSH/LH n'indique pas le nombre exact de GF préovulatoires ; en effet, seuls les GF d'un diamètre de 6 mm sont susceptibles d'ovuler. Le tableau suivant reprend le pourcentage de GF préovulatoires (GFPO) obtenus après stimulation ovarienne.

Tableau 20 : GF et GFPO après stimulation ovarienne (septembre 2004)

Groupes expérimentaux	Total GF (4-7 mm)	Total GFPO (6-7 mm)	Rapport (%)
<b>Témoin</b>	32	18	56
<b>Buséréline</b>	76	54	71
Décapeptyl	15	10	67

Les pourcentages de GF présentant une taille préovulatoire sont légèrement plus élevés pour les lots traités à la Buséréline et au Décapeptyl que pour le lot Témoin. Cela indique que , pour les follicules qui ont pu être recrutés, la vitesse de croissance et le phénomène de dominance n'ont pas été influencés par les traitements préalables éventuels aux GnRHa. Néanmoins, pour le lot Décapeptyl, le nombre total de GF et le nombre total de GFPO sont plus faibles que pour le lot Témoin. Par contre, le groupe Buséréline possède 3 fois plus de GFPO que le lot Témoin.

### 1.3 Résultats du taux d'ovulation (T.O) et de la récolte des embryons

#### 1.3.1 Le taux d'ovulation

La récolte des embryons a été tentée lors de la troisième endoscopie chez les brebis possédant un nombre suffisant de CJ. Ce nombre est le reflet des ovulations déclenchées chez les animaux ; c'est pourquoi on parlera indifféremment de nombre de CJ ou de TO (taux d'ovulation). Le tableau 21 trace un récapitulatif des populations folliculaires et lutéales chez la brebis. La figure 20 détaille, sous forme d'histogramme, l'évolution des GF en CJ après insémination.

*Tableau n° 21 : population folliculaire et lutéale lors de la récolte des embryons (septembre 2004)*

		<b>Témoin</b>	<b>Buséréline</b>	<b>Décapeptyl</b>
<b>Après stimulation ovarienne</b>	<i>PF</i>	7,0 ± 6,4 <sup>b</sup>	6,4 ± 3,5 <sup>b</sup>	15,4 ± 3,8 <sup>a</sup>
	<i>GF</i>	6,2 ± 3,6 <sup>b</sup>	15,2 ± 6,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 3,1 <sup>b</sup>
	<i>CJ</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Lors de la récolte</b>	<i>PF</i>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,4 ± 7,6 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
	<i>GF</i>	0,2 ± 0,4	1,4 ± 1,9	2,4 ± 2,3
	<i>CJ</i>	3,6 ± 3,4 <sup>b</sup>	13,2 ± 9,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 3,0 <sup>b</sup>

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Chez les brebis Témoin, le nombre de GF et de GFPO était faible et ne pouvait engendrer un TO important. C'est ce qui s'est vérifié.

Le groupe Buséréline est le seul à présenter des PF lors de la récolte des embryons. Ceci est dû à une seule brebis qui possède 17 PF. Deux brebis possèdent encore des GF (3 et 4 GF).

Toutes les brebis de ce lot possèdent des CJ dont le nombre varie entre 6 et 23 par brebis. Le TO du groupe Buséréline (13,2 de moyenne) est le plus élevé des trois lots. Le nombre de CJ obtenu pour le lot Buséréline est significativement plus élevé que dans les deux autres lots (P<0,05).

Chez le groupe Décapeptyl, aucune brebis ne présente de PF en surface de l'ovaire. Seulement 3 brebis sur 5 présentent des GF (3 à 5 GF). Le nombre de CJ est faible par rapport aux groupes Buséréline et Témoin. Il n'y a que 2 brebis qui possèdent des CJ.

#### 1.3.2 Analyse

Afin de voir si les follicules qui avaient atteint une taille préovulatoire à la fin de la stimulation se sont effectivement transformés en CJ après ovulation, le pourcentage de GFPO qui ont réalisé la maturation et atteint l'ovulation a été calculé (tableau 22).



Tableau n° 22 : Taux d'ovulation (septembre 2004)

Groupes expérimentaux	GF PO	CJ	Rapport (%)
Témoin	18	18	100
Buséréline	54	66	122
Décapeptyl	10	9	90

On observe que pour les trois groupes le rapport est proche de 100 %, les GFPO se sont en général transformés en CJ. L'étude statistique mettant en corrélation le nombre de GF après stimulation et le nombre de CJ obtenus après IAIU montre qu'il existe une corrélation positive ( $r = 0,69$ ) entre ces deux facteurs pour les trois traitements concernés. Cette corrélation est significative ( $P < 0,05$ ). (figure 21).

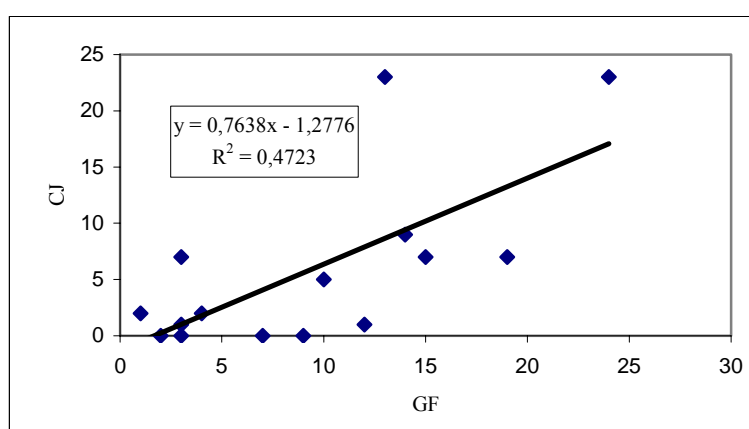


Figure 21 : Relation entre le nombre de GF après traitement FSH et le nombre de CJ après IAIU (septembre 2004)

Chez les brebis du lot Buséréline, un nombre assez important de follicules qui n'avaient pas atteint le diamètre de 6 mm ont pu ovuler. Ce phénomène assez particulier pourrait signifier que la Buséréline, qui facilite la croissance des follicules (Tableau 20), facilite également leur maturation.

### 1.3.3 Le transfert des embryons

Le tableau n° 23 indique le nombre d'embryons récoltés et leur transfert chez les receveuses. Les trois receveuses qui ont reçu un ou deux embryons ont été échographiées ultérieurement. Seule, la receveuse n° 4.7249 était gestante.

Tableau n° 23 : nombre d'embryons récoltés et transférés (septembre 2004)

Groupes expérimentaux	N° Brebis	Nombre d'embryons récoltés	Nombre d'embryons transférés	Receveuses
Témoin	-	-	-	-
Buséréline	7	1	1	9.1803
	8	1	1	4.7249
Décapeptyl	15	2	2	8.3119

Le tableau suivant représente le nombre d'embryons récoltés (ER) par rapport au nombre de CJ obtenus chez les brebis prélevées après traitement de superovulation.

*Tableau n° 24 : nombre d'embryons récoltés et transférés (septembre 2004)*

<b>Groupes expérimentaux</b>	<b>CJ</b>	<b>ER</b>	<b>TR (%)</b>
<b>Témoin</b>	18	-	-
<b>Buséréline</b>	46	2	5
<b>Décapeptyl</b>	7	2	28

Le lot témoin ne peut être analysé, car aucune brebis n'a fait l'objet d'un essai de collecte d'embryons. Pour les trois brebis dont la collecte d'embryon a été tentée, le taux global de récupération est faible. Il est sans conteste dû à la technique, tentée pour la première fois avec le nouveau matériel.

## **2 Résultats de l'expérience de février 2005**

### **2.1 Résultats du blocage hypophysaire**

Pour rappel, par rapport à l'essai précédent, le relargage de Buséréline a été diminué de 100 µg à 40 µg/jour comme le préconise la littérature et l'injection de 3 mg de Décapeptyl a été remplacée par 2 injections de 1 mg pour tenter à la fois de prolonger l'effet inhibiteur sur l'hypophyse et diminuer l'effet inhibiteur sur la croissance des follicules. En effet, des décharges de LH endogènes avaient été mesurées avant l'injection de LH endogènes et le taux de recrutement des PF avait été particulièrement faible (figure 22).

#### **2.1.1 Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH**

##### **2.1.1.1 LH**

La figure 23 montre l'évolution de la concentration en LH plasmatique pour le lot Buséréline, le lot Témoin et le lot Décapeptyl<sup>3</sup>. On observe chez tous les animaux une décharge de LH consécutive à l'administration des agonistes du GnRH. Les trois lots présentent un profil semblable. Le groupe Témoin montre en effet aussi une élévation de LH marquée ; ceci est dû à une brebis qui a présenté une décharge très importante et marquée.

Pour le groupe Décapeptyl, les taux de LH plasmatiques chutent entre la première injection et la stimulation ovarienne. La brebis 18 présente tout au long de l'expérience des concentrations de LH 5 à 10 fois supérieures aux autres brebis du lot. C'est pourquoi, cet animal atypique a été exclu des analyses statistiques.

Tout au long de la période de traitement avec les agonistes, aucune différence significative n'est mesurée entre les trois lots.

##### **2.1.1.2 FSH**

La figure 24 montre l'évolution de la concentration en FSH plasmatique pour le lot Buséréline, le lot témoin et le lot Décapeptyl<sup>4</sup>.

Chez les brebis Témoins, 3 animaux présentent des taux de FSH atypiques, supérieurs à 3 ng/ml, ce qui n'arrive chez aucun autre animal des autres groupes. La moyenne s'en trouve fortement affectée.

Chez toutes les brebis des lots Buséréline et Décapeptyl, la sécrétion de FSH a présenté une hausse significative juste après l'administration des GnRHa, puis les concentrations plasmatiques sont revenues à des concentrations normales (excepté pour la brebis 15 du lot Décapeptyl caractérisée par des taux plasmatiques proches de 0 ng/ml tout au long de l'expérience. Cette brebis, suspectée d'un problème physiologique, a été exclue des analyses statistiques.

Comme pour l'expérience précédente, une analyse statistique a été réalisée afin de comparer le taux de FSH mesuré avant le début du traitement pour chacun des trois lots avec celui obtenu pendant l'effet maximum supposé du traitement.

<sup>3</sup> Les profils individuels de LH se trouvent en annexe à la figure 23B

<sup>4</sup> Les profils individuels de FSH se trouvent en annexe à la figure 24B

Il n'existe pas de diminution significative du taux de FSH dans les deux groupes traités. Au contraire, les taux de FSH ont tendance à augmenter légèrement.

Le groupe témoin présente une différence hautement significative ( $P > 0,01$ ) des taux de FSH par rapport aux groupes traités à la Buséréline et au Décapeptyl. Les groupes Buséréline et Décapeptyl ne présentent pas de différence significative entre eux, que ce soit pour les taux de FSH avant ou pendant traitement avec les GnRH $\alpha$  (figure 20).

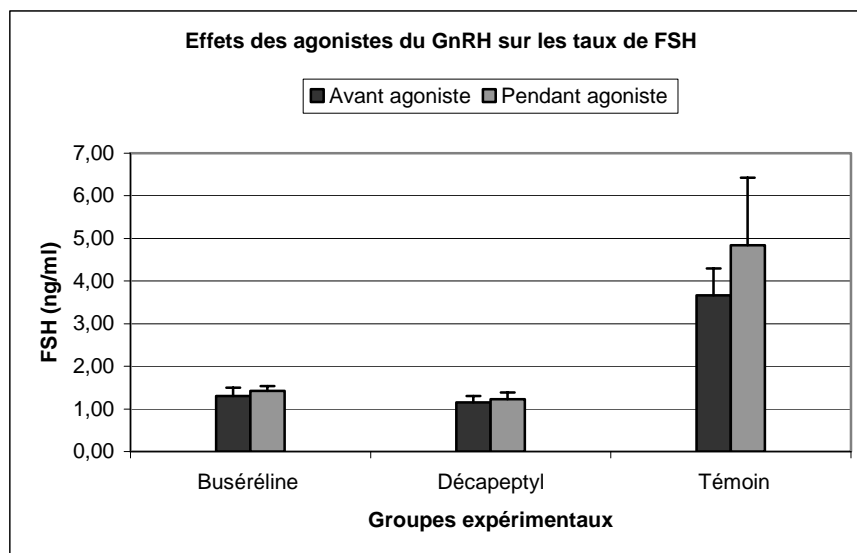


Figure 25 : Effet des agonistes sur les taux de FSH (février 2005)

### 2.1.2 Les populations folliculaires

Après blocage, les résultats obtenus (tableau 25) ne montrent aucune modification du nombre des PF ou des GF Pour les brebis traitées à la Buséréline comme chez les Témoin. Par contre, chez les animaux traités au Décapeptyl, malgré une absence d'effet sur le taux des hormones gonadotropes, la population folliculaire a évolué, avec une augmentation significative de PF et une chute du nombre de GF. Les résultats sont repris sous forme d'histogramme à la figure 26.

Tableau n° 25 : nombre de follicules avant et après blocage hypophysaire (février 2005)

		Témoin	Buséréline	Décapeptyl
Avant blocage	PF	19,4 ± 11,1	17,2 ± 5,5	14,2 ± 8,3
	GF	2,8 ± 1,8 <sup>b</sup>	7,6 ± 3,2 <sup>a</sup>	7,0 ± 3,4 <sup>a</sup>
Après blocage	PF	21,0 ± 11,6 <sup>b</sup>	24,8 ± 7,2 <sup>b</sup>	37,2 ± 13,6 <sup>a</sup>
	GF	4,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	4,2 ± 4,5 <sup>b</sup>	1,4 ± 1,1 <sup>b</sup>

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b,  $P < 0,05$ ) à l'intérieur d'une ligne

On observe pour le groupe Buséréline une moyenne de 17,2 PF avant blocage et une moyenne de 24,8 PF après blocage. L'analyse statistique de ces données montre que la population de PF est augmentée de manière non significative ( $P > 0,05$ ). La population de GF montre une moyenne de 7,6 avant blocage et de 4,2 après blocage. Cette population a diminué sous l'effet de la Buséréline, mais de manière non significative ( $P > 0,05$ ). La comparaison de ces deux

populations avec celles du groupe Témoin montre qu'il n'existe pas de différence significative entre ces deux populations.

Le groupe traité avec le Décapeptyl semble être le groupe ayant le mieux répondu au blocage hypophysaire. Il présente 14,2 PF avant blocage et 37,2 PF après blocage en moyenne. L'étude statistique de ces données montre une augmentation significative de cette population folliculaire ( $P < 0,05$ ). La population de PF du groupe Décapeptyl a une moyenne qui a tendance à être significativement différente ( $P = 0,076$ ) de celle des 2 autres groupes traités. Les GF passent de 7 en moyenne avant le blocage à 1,4 GF après celui-ci. La diminution observée est hautement significative ( $P < 0,01$ ). La comparaison de ces deux populations avec celle du groupe Témoin présente aussi une tendance à être significative ( $P = 0,073$ ).

### 2.1.3 Analyse

Comme pour septembre, on observe une corrélation négative entre le nombre de PF présents après blocage et le taux de FSH en fin de traitement. Le nombre de PF décroît quand le taux de FSH augmente. Par opposition à l'expérience de septembre, l'analyse est basée sur des animaux dont l'hypophyse ne semble pas avoir été affectée par le traitement au GnRH $\alpha$ .

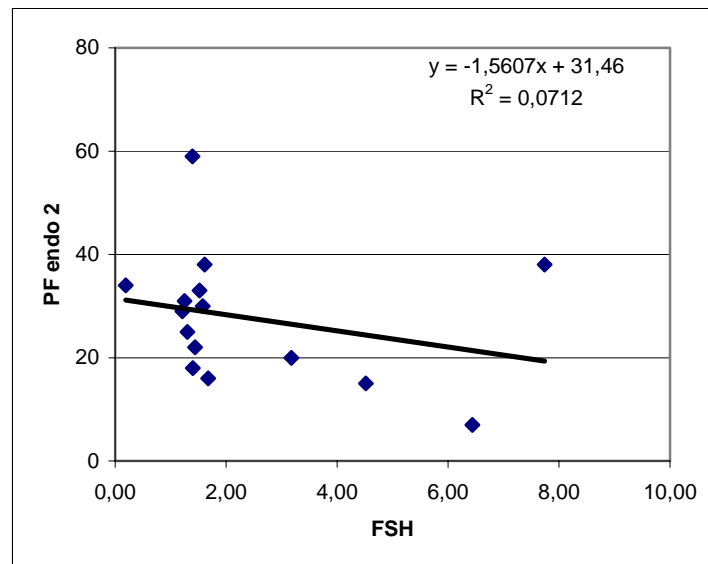


Figure 27 : relation entre le nombre de PF lors de la deuxième endoscopie et les taux sanguins de FSH à la fin du traitement au GnRH $\alpha$  (février 2005)

## 2.2 Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH

### 2.2.1 Injections de pFSH et pLH

Le groupe Témoin présente des taux de FSH qui fluctuent tout au long de l'expérience. On n'observe pas de hausse marquée du taux de FSH lors des injections de pFSH exogène.

Dans le groupe Buséréline, on observe deux pics de LH : un pic 1 jour avant l'injection de LH et un pic lors de l'injection. L'étude individuelle de cette moyenne révèle que trois brebis (6, 8, et 9) possèdent ces deux pics.

En ce qui concerne le groupe Décapeptyl, la moyenne montre des valeurs très élevées par rapport aux deux autres groupes. Ceci est dû à la brebis n° 18 qui possède des valeurs élevées

tout au long de l'expérience ; c'est pourquoi elle fut exclue des analyses statistiques. Néanmoins, les autres brebis du groupe présentent un pic de LH lors de l'injection (figure 23).

Pendant la période des injections de FSH, une augmentation significative des concentrations plasmatiques est bien enregistrée chez les brebis des groupes traités au GnRHa, signe de l'efficacité du protocole d'injection pour maintenir une stimulation folliculaire constante (figure 24).

### 2.2.2 Les populations folliculaires

Les résultats obtenus lors de la troisième endoscopie se trouvent repris dans le tableau suivant (tableau 26). On s'attend à obtenir une augmentation des GF suite au traitement FSH/LH.

Tableau 26 : population folliculaire après stimulation ovarienne (février 2005)

		Témoin	Buséréline	Décapeptyl
Avant Stimulation	PF	21 ± 11,6 <sup>b</sup>	24,8 ± 7,2 <sup>b</sup>	37,2 ± 13,6 <sup>a</sup>
	GF	4,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	4,2 ± 4,5 <sup>b</sup>	1,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
Après stimulation	PF	8,8 ± 7,9	14,4 ± 9,6	15 ± 4,9
	GF	15,4 ± 14,2	12,6 ± 3,2	12,2 ± 2,4

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

C'est ce qui est observé chez les brebis du groupe Témoin chez qui le nombre de GF a plus que triplé.

Dans le groupe Buséréline, l'analyse statistique montre que les GF ont augmenté de manière hautement significative (P<0,01) après traitement FSH/LH pour le groupe Buséréline. De 4,2 GF de moyenne, le groupe Buséréline passe à 12,6. La brebis n° 6 possède encore un corps jaune : elle a donc ovulé avant l'IAIU.

Pour le groupe Décapeptyl, l'analyse statistique montre que les GF ont subi une augmentation hautement significative (P<0,01). Le groupe Décapeptyl présente 1,4 GF avant la stimulation avec FSH/LH et 12,2 GF après cette stimulation.

### 2.2.3 Analyse

Comme pour l'expérience de septembre, on peut mettre en relation le nombre de GF après la stimulation FSH/LH et le pool de PF obtenus après blocage hypophysaire. Le tableau 26 reprend le taux de PF « recrutables » qui ont évolué en GF (figure 28).

Tableau 27 : PF recrutables et recrutés lors de la stimulation ovarienne (février 2005)

	Témoin	Buséréline	Décapeptyl
PF recrutables	21 ± 11,6 <sup>b</sup>	24,8 ± 7,2 <sup>b</sup>	37,2 ± 13,6 <sup>a</sup>
GF recrutés	15,4 ± 14,2	12,6 ± 3,2	12,2 ± 2,4
Recrutement %	73	51	33

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Le groupe Témoin montre un taux de recrutement plus élevé que les deux autres lots. Les brebis Décapeptyl présentent à nouveau le pourcentage le plus bas de recrutement et ce de manière hautement significative (P<0,01). Il semble donc que les GnRHa administrés en quantité

insuffisante pour induire un blocage hypophysaire ont néanmoins présenté un effet négatif sur l'évolution des follicules.

Néanmoins, pour tous les groupes confondus, il existe une corrélation positive ( $r = 0,52$ ) entre le nombre de GF obtenus après stimulation et le nombre de PF présents avant cette stimulation. Cette corrélation est hautement significative ( $P < 0,001$  ; figure 29).

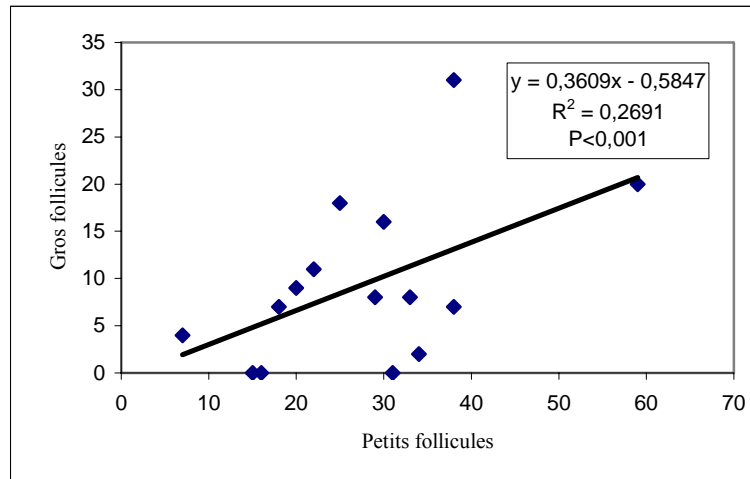


Figure 29 : relation entre le nombre de PF recrutables et le nombre de GF recrutés (février 2005)

Le but de la stimulation n'est pas seulement d'obtenir des GF mais surtout des GFPO susceptibles d'atteindre l'ovulation (tableau 28).

Tableau 28 : GF et GFPO après stimulation ovarienne (février 2005)

Groupes expérimentaux	Total GF	Total GFPO	Rapport (%)
Témoin	77	63	81,8
Busérelène	63	53	84,1
Décapeptyl	61	47	77,0

Les pourcentages de GFPO par rapport aux GF ne sont pas significativement différents. La différence entre le nombre total de GF des différents lots n'est pas significative non plus ( $P = 0,8$ ). Chez les Témoin et les Décapeptyl, la stimulation a permis l'apparition d'un nombre plus important de GFPO qu'en septembre.

## 2.3 Résultats du taux d'ovulation (T.O.) et de la récolte des embryons

### 2.3.1 Le taux d'ovulation

Au moment de la collecte des embryons, les ovaires sont à nouveau observés avec précision afin de dénombrer les corps jaunes, signes des ovulations, et aussi de mesurer la capacité des GF, dont la croissance avait été induite par la FSH, à mûrir et atteindre l'ovulation (tableau 29).

Tableau n° 29 : population folliculaire et lutéale lors de la récolte des embryons (février 2005)

		<b>Témoin</b>	<b>Buséréline</b>	<b>Décapeptyl</b>
<b>Après stimulation ovarienne</b>	<i>PF</i>	8,8 ± 7,9	14,4 ± 9,6	15 ± 4,9
	<i>GF</i>	15,4 ± 14,2	12,6 ± 3,2	12,2 ± 2,4
	<i>CJ</i>	0,0 ± 0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0
<b>Lors de la récolte</b>	<i>PF</i>	0,6 ± 1,3	7,4 ± 11,0	3,4 ± 7,6
	<i>GF</i>	1,6 ± 3,6	2,2 ± 4,4	0,2 ± 0,4
	<i>CJ</i>	12,4 ± 12,4	6,2 ± 6,6	9,6 ± 6,7

Dans le lot Témoin, au lendemain de l'injection de LH destinée à induire l'ovulation, les ovaires ne portent presque plus de petits ni de gros follicules et le TO de 12,4 est semblable à celui qui est observé habituellement (mais pas en septembre 2004).

Le lot traité à la Buséréline possède 3 brebis avec des PF (2 à 26 PF) ; il présente le nombre le plus élevé de petits follicules. Deux brebis possèdent encore des GF (1 et 10 GF). Les moyennes de PF et GF comptabilisés lors de la récolte ne diffèrent pas significativement entre les trois lots considérés. En ce qui concerne le TO, seulement 3 brebis sur 5 possèdent des CJ (7 à 16 CJ). A cause des deux brebis qui n'ont pas ovulé, le TO du groupe Buséréline est le moins élevé des trois lots. Pourtant, il ne diffère pas significativement des autres lots.

Le lot Décapeptyl présente 1 brebis avec 17 PF et 1 GFPO. Les autres brebis du lot ne possèdent plus ni GF, ni PF.

Le TO du Décapeptyl est plus élevé que celui de la Buséréline. Toutes les brebis possédaient des CJ lors de la récolte des embryons (2 à 20 CJ). Le TO obtenu est proche de celui du lot Témoin.

### 2.3.2 Analyse

Si le nombre de GF préovulatoires était assez semblable entre les lots, le taux de ceux qui ont pu se transformer en corps jaunes est significativement plus faible chez les brebis traitées à la Buséréline (à peine plus de la moitié alors que presque tous ont pu évoluer positivement dans les autres groupes (tableau 30 et figure 30).

Tableau n° 30 : taux d'ovulation (février 2005)

<b>Groupes expérimentaux</b>	<b>GF PO</b>	<b>CJ</b>	<b>Rapport (%)</b>
<b>Témoin</b>	63	62	98
<b>Buséréline</b>	53	31	58
<b>Décapeptyl</b>	47	48	102

L'étude statistique mettant en corrélation le nombre de GF après stimulation et le nombre de CJ obtenus après IAIU montre qu'il existe une corrélation positive ( $r = 0,73$ ) entre ces deux facteurs pour les trois traitements concernés. La relation entre ces deux facteurs est significative ( $P < 0,05$  ; figure 31).



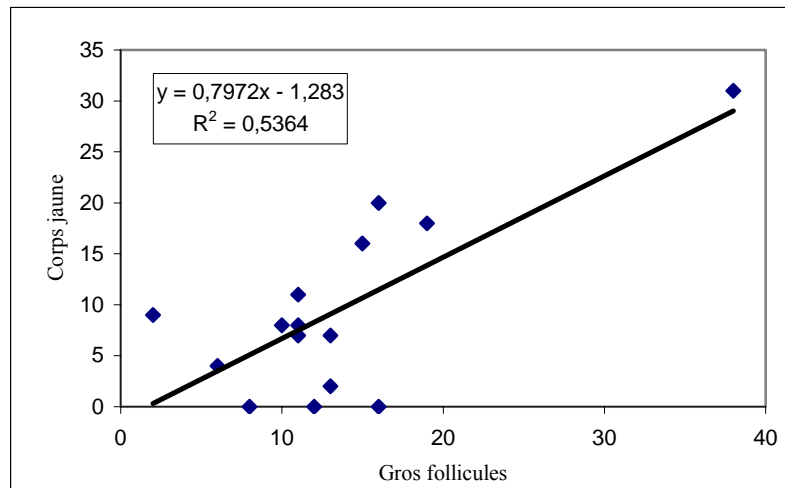


Figure 31: relation entre le nombre de GF après stimulation et le nombre de CJ après IAIU (février 2005).

## 2.3.3 Collecte et transfert des embryons

### 2.3.3.1 Collecte des embryons

La récolte des embryons constitue une étape délicate dans le processus. Afin de réduire le stress infligé aux animaux et le caractère « invasif » de l'intervention, une méthode 100 % laparoscopique a été inaugurée, avec peu de succès, en septembre et testée à nouveau en février après une adaptation des volumes injectés dans l'utérus pour entraîner les embryons.

Les résultats ont été beaucoup plus intéressants et un certain nombre d'embryons surnuméraires ont été soumis au protocole de vitrification (tableau 31).

Tableau n° 31 : nombre d'embryons récoltés et transférés en février 2005

Groupes expérimentaux	N° Brebis	Nombre embryons récoltés	Nombre d'embryons cryopréservés	Nombre d'embryons transférés	Receveuses
Témoin	2	8	6	2	7285
	5	4	4	4	7149 (2) et 7199 (2)
Buséréline	6	2	0	2	3287
	9	1	0	1	7205
Décapeptyl	11	5	0	5	3199 (2), 3090 (2), 7297 (1)
	18	2	0	2	7297
	13	3	0	3	1803
	14	1	0	1	1803

Chez les brebis Témoin, les 2 animaux chez qui la collecte a été effectuée totalisaient 49 corps jaunes et ont donné 12 embryons soit un taux de récolte de 25 %. Dans le lot Buséréline le taux de récolte obtenu sur les 2 brebis a été de 20 %, tandis que dans le lot Décapeptyl, 4 brebis présentaient un nombre intéressant de CJ (total de 46) et ont donné 11 embryons, soit un TR de 24 (tableau 32).

*Tableau n° 32 : nombre d'embryons récoltés et transférés (février 2005)*

<b>Groupes expérimentaux</b>	<b>CJ</b>	<b>ER</b>	<b>TR (%)</b>
<b>Témoin</b>	49	12	25
<b>Buséréline</b>	15	3	20
<b>Décapeptyl</b>	46	11	24

### **2.3.3.2 Transfert des embryons**

Comme le montre le tableau 30, tous les embryons collectés ont finalement été transférés à des brebis receveuses, quelque soit leur qualité et leur parcours (transfert direct ou après vitrification – décongélation).

Bien que la technique de transfert soit simple et rapide, son résultat, d'habitude excellent, a été cette fois désastreux puisqu'une seule brebis a été diagnostiquée gestante à l'échographie réalisée 40 jours après l'IA.

### **3 Résultats de l'expérience de mai 2005**

#### **3.1 Rappel des objectifs**

Cette expérience a été mise en place afin de comparer l'effet de deux protocoles de stimulation ovarienne, l'une utilisant de la FSH hautement purifiée selon le protocole FSH/LH habituel, l'autre utilisant le Stimufol qui est de la FSH présentant une contamination de 20 % de LH, puis la LH selon le protocole habituel. Ce protocole a été appliqué chez deux groupes subissant chacun un blocage hypophysaire à la Buséréline à raison de 140 µg/jour. Les objectifs précédents restent d'application. Pour rappel, la figure 32 reprend le schéma expérimental de cette expérience.

#### **3.2 Le Blocage hypophysaire**

##### **3.2.1 Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH**

###### **3.2.1.1 LH**

La figure 33 illustre les profils moyens de LH pour le lot Buséréline-FSH et Buséréline-Stimufol<sup>5</sup>. Les résultats obtenus des Brebis 3 et 9 pour le dosage de la LH ont été éliminés. Il y a eu des erreurs de manipulations sur la série de tubes correspondants qui ont entraîné des taux de LH 10 fois supérieurs aux autres.

Pour les deux lots traités, on observe une fluctuation des taux de LH tout au long de l'expérience. La LH ayant une sécrétion pulsatile, il est impossible de voir avec notre protocole de prises de sang si le blocage s'est effectué réellement sur cette hormone.

Le groupe traité avec de la FSH ultrapurifiée présente des valeurs variant entre 0,2 et 1 ng/ml tandis que le groupe traité avec le Stimufol possède des valeurs variant entre 0 et 2 ng/ml.

###### **3.2.1.2 FSH**

Les deux groupes traités à la Buséréline présentent un profil similaire des taux de FSH (figure 34<sup>6</sup>). Après insertion des pompes osmotiques, on observe un pic de FSH induit par le GnRHa. Ensuite, les taux de FSH diminuent progressivement dans les deux groupes traités.

Comme pour l'expérience précédente, une comparaison statistique a été réalisée afin de comparer le taux de FSH présent avant le début du traitement pour chacun des deux lots avec celui obtenu pendant l'effet maximum supposé du traitement (figure 30).

Les deux groupes traités présentent une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) des taux de FSH suite au traitement avec les agonistes. La comparaison des moyennes des taux de FSH avant et pendant le traitement à la Buséréline montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux lots traités. Les deux lots ont donc subi un blocage hypophysaire semblable.

<sup>5</sup> La figure 33B, en annexe, illustre les profils individuels des deux lots.

<sup>6</sup> La figure 34B, en annexe, illustre les profils individuels des deux lots.

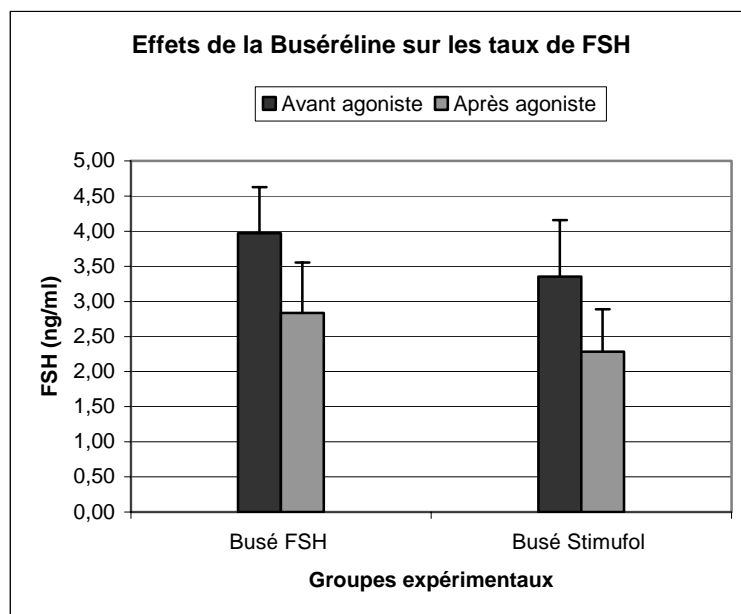


Figure 35 : Effets de la Buséréline sur les taux de FSH (mai 2005)

### 3.2.2 Population folliculaire

Les deux lots sont semblables et ont reçu un traitement au GnRH $\alpha$  identique. Leur réponse en termes de sécrétions gonadotrophes ont été semblables. Nous étudierons leur réponse ovarienne après avoir réuni les deux groupes de brebis (figure 36).

Tableau 33 : Nombre de follicules après blocage hypophysaire (mai 2005)

		2 groupes
Avant blocage	PF	21,9 $\pm$ 14,4
	GF	2,3 $\pm$ 1,5
Après blocage	PF	33,6 $\pm$ 10,6
	GF	0,0 $\pm$ 0,0

Les deux groupes présentent une augmentation significative du nombre de PF après le traitement bloquant à la Buséréline ( $P < 0,05$ ). Il existe au total 6 brebis sur 10 qui présentent des corps jaunes et ce malgré la pose d'éponges vaginales de P4 et le blocage hypophysaire.

On observe également pour les deux groupes une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) du nombre des GF après blocage. Le nombre des GF tombe à zéro après traitement.

### 3.2.3 Analyses

Il est intéressant de mettre en relation le nombre de PF présents avant la première injection de FSH (lors de la deuxième endoscopie) et le taux de FSH au jour 11. On obtient une corrélation négative non-significative entre le nombre de PF et le taux de FSH.

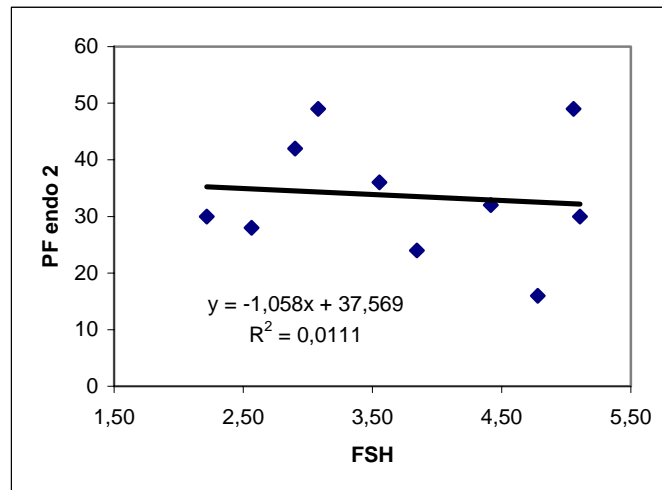


Figure 37 : relation entre le nombre de PF lors de la deuxième endoscopie et les taux sanguins de FSH à la fin du traitement au GnRH $\alpha$  (mai 2005)

Contrairement aux deux expériences précédentes, on ne peut pas mettre en évidence une relation entre le nombre de PF après blocage et les taux sanguins de FSH à la fin de celui-ci.

### 3.3 La stimulation ovarienne

#### 3.3.1 Injections de FSH et LH purifiées

Les injections de LH exogènes ne peuvent normalement pas être vues sur les graphiques des dosages étant donné que la LH présente un temps de demi-vie très court (20 min) et que l'on réalise la prise de sang 7 h après son injection. Cependant, on peut observer pour septembre et février des élévations des taux de LH lors des injections. Celles-ci ont été attribuées à des décharges endogènes induites par l'E2 des follicules en plein développement. Par contre, pour cette expérience, on observe une diminution significative des taux de LH des deux groupes traités à partir du 25 mai jusqu'au 31 mai. C'est-à-dire dès la première injection de FSH exogène jusqu'à la fin des injections de LH exogènes. Les taux remontent après l'arrêt des traitements de stimulation. (figure 33). La différence par rapport aux expériences précédentes est attribuée à un blocage plus profond de l'hypophyse avec ses doses maximales de Buséréline.

Le groupe Busé FSH montre une augmentation significative classique de ses taux plasmatiques de FSH lors des injections de pFSH exogènes. Une seule brebis du lot possède des taux moindres (5 ng/ml) que les autres du lot (10 ng/ml) lors de la stimulation.

Toutes les brebis du groupe Busé Stimufol présentent, lors de la stimulation, des taux de FSH qui avoisinent les 5 ng/ml excepté une seule brebis qui a des taux plus élevés (10 ng/ml) (figure 34).

#### 3.3.2 Point de vue ovarien

Les deux protocoles utilisés pour la stimulation ovarienne vont être comparés au niveau de l'augmentation du nombre de GF. Le tableau 34 reprend les résultats obtenus lors de la deuxième endoscopie et la figure 38 reprend sous forme d'histogramme l'évolution des GF suite à la stimulation.

*Tableau 34 : population folliculaire après stimulation ovarienne (mai 2005)*

		<b>Busé FSH</b>	<b>Busé Stimufol</b>
<b>Avant Stimulation</b>	<i>PF</i>	31,2 ± 6,7	37,5 ± 15,6
	<i>GF</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Après stimulation</b>	<i>PF</i>	8,0 ± 4,3	12,2 ± 7,2
	<i>GF</i>	8,4 ± 6,0	10,2 ± 7,3

Dans le lot traité à la FSH ultrapurifiée, on observe une augmentation significative ( $P < 0,01$ ) du nombre des GF qui passent de 0,0 à 8,4 de moyenne. La brebis n° 1 possède encore un CJ actif lors de l'endoscopie. Toutes les brebis de ce lot possèdent entre 4 et 14 GF par brebis.

Dans le lot stimulé avec la préparation commerciale de FSH présentant 20 % d'activité LH, on observe également une augmentation significative ( $P < 0,01$ ) du nombre des GF qui passent de 0,0 à 10,2 de moyenne. Aucun animal du groupe ne possède de CJ. Trois des 5 brebis présentent un nombre élevé de GF ( $> 15$  GF).

Le nombre de GF obtenus après stimulation dans les deux groupes traités ne diffère pas de l'un à l'autre. Il semble donc que la pureté de la FSH employée n'a pas influencé la croissance des follicules lors de cette stimulation.

### 3.3.3 Analyse

On peut observer que les taux de recrutement obtenus lors de cette troisième expérience sont très bas par rapport aux deux autres expériences, de l'ordre de ce qui avait été enregistré suite au blocage hypophysaire avec le Décapeptyl. Le groupe traité avec le Stimufol possède un plus haut taux de recrutement pour cette troisième expérience (tableau 34) ; mais la différence n'est pas significative.

*Tableau 35 : PF recrutables et GF recrutés lors de la stimulation ovarienne (mai 2005)*

	<b>Busé FSH</b>	<b>Busé Stimufol</b>
<b>PF recrutables</b>	31,2 ± 6,7	37,5 ± 15,6
<b>GF recrutés</b>	8,4 ± 6,0	10,2 ± 7,3
<b>Recrutement %</b>	27	33

L'étude statistique de ces populations a permis de mettre en évidence une corrélation positive ( $r = 0,75$ ) entre le nombre de PF recrutables et le nombre de GF recrutés (figure 39) ; celle-ci est hautement significative ( $P < 0,001$ ).

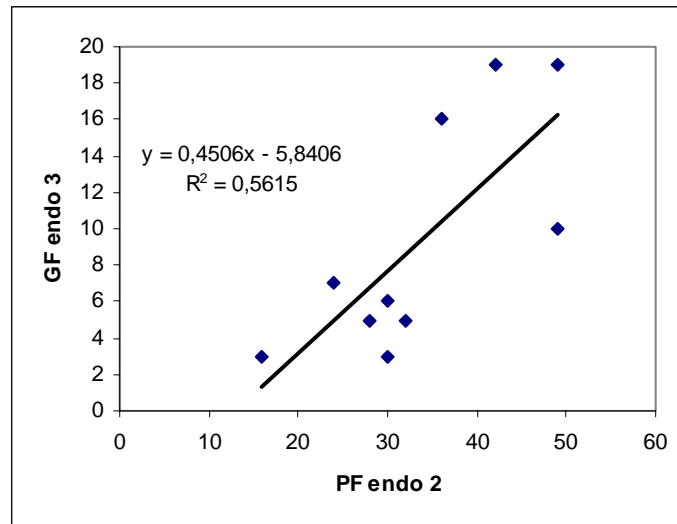


Figure 39 : relation entre le nombre de PF recrutables et le nombre de GF recrutés (mai 2005)

Mais si relativement peu de follicules accumulés sur l'ovaire ont été recrutés, le pourcentage de ceux-ci qui ont atteint un diamètre préovulatoire est important et semblable à celui des essais précédents (tableau 36).

Tableau 36 : GF et GFPO après stimulation ovarienne (mai 2005)

Groupes expérimentaux	Total GF	Total GFPO	Rapport (%)
Busé FSH	42	36	86
Busé Stimufol	51	39	76

Le groupe traité au Stimufol présente plus de GF et de GFPO que celui traité avec de la FSH. Cependant, on remarque que le groupe traité à la FSH a amené au stade préovulatoire 86 % de ces GF, tandis que le groupe traité au Stimufol en a amené à ce stade 10 % de moins.

### 3.4 Résultats du taux d'ovulation et de la récolte des embryons

#### 3.4.1 Le taux d'ovulation

L'observation des ovaires au moment programmé pour la collecte d'embryons a montré un résultat très mauvais de la stimulation hormonale sur l'évolution des follicules (tableau 36). Peu de brebis ont ovulé et les TO ont été très faibles, de gros follicules (diamètre >10 mm) d'aspect kystique persistent sur les ovaires de certaines brebis. Un défaut évident dans le processus de l'ovulation s'est manifesté lors de cette expérience.

Tableau n° 37 : population folliculaire et lutéale enregistrée lors de la récolte des embryons (mai 2005)

		<b>Busé FSH</b>	<b>Busé Stimufol</b>
<b>Après stimulation ovarienne</b>	<i>PF</i>	8,0 ± 4,3	12,2 ± 7,2
	<i>GF</i>	8,4 ± 6,0	10,2 ± 7,3
	<i>CJ</i>	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
<b>Lors de la récolte</b>	<i>PF</i>	16,4 ± 7,4	15,6 ± 5,7
	<i>GF</i>	2,0 ± 2,4	2,8 ± 2,8
	<i>CJ</i>	0,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,4 ± 3,6 <sup>a</sup>

Les moyennes qui diffèrent significativement sont signalées avec des lettres différentes (a,b, P<0,05) à l'intérieur d'une ligne

Dans le groupe traité à la FSH ultrapurifiée, seules 3 brebis possèdent des CJ. Des 4 CJ observés au total, seulement 2 sont actifs, les autres ont entamé un processus de lutéolyse (VCJ). Le nombre de CJ est significativement faible par rapport au nombre de GFPO obtenus après stimulation, de l'ordre de 5 %. La variabilité individuelle est élevée.

De plus, on observe dans ce groupe traité une brebis possédant 6 GF kystiques de plus de 10 mm de diamètre. Cette brebis (n°5) possède des taux de FSH qui ont augmenté et qui se maintiennent élevés (au alentour de 8,5 ng/ml) après la stimulation ovarienne et l'arrêt de l'apport de FSH exogènes.

Dans le groupe traité avec du Stimufol, seulement 2 brebis présentent des CJ actifs. La variabilité individuelle est très élevée : deux brebis possèdent 6 et 8 CJ alors que les trois autres ne possèdent aucun CJ. Le nombre de CJ est significativement faible par rapport au nombre de GFPO obtenus après stimulation. Une brebis de ce lot possède des follicules kystiques de plus de 10 mm (tableau 37 ; figure 40).

Tableau n° 37 : taux d'ovulation (mai 2005)

<b>Groupes expérimentaux</b>	<b>GF PO</b>	<b>CJ</b>	<b>Rapport (%)</b>
<b>Busé FSH</b>	36	2	6
<b>Busé Stimufol</b>	39	12	31

### 3.4.2 Analyses

L'étude statistique mettant en corrélation le nombre de GF après stimulation et le nombre de CJ obtenus après IAIU, montre qu'il existe une corrélation positive ( $r = 0,53$ ) entre ces deux facteurs pour les trois traitements concernés. Cette corrélation est hautement significative ( $P < 0,01$ ) (Figure 35). Plus le nombre de GF est élevé après la stimulation ovarienne, plus on obtiendra de CJ lors de la récolte des embryons.



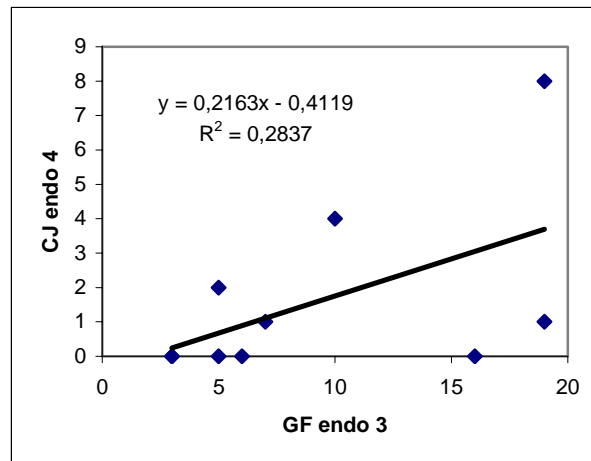


Figure 35: relation entre le nombre de GF après stimulation et le nombre de CJ après IAIU (mai 2005)

### 3.4.3 La récolte des embryons

Étant donné les résultats des taux d'ovulation obtenus lors de la récolte des embryons, seulement une brebis a été collectée : la brebis n° 8 du groupe Stimufol (8 CJ). Aucun embryon n'a été obtenu. Il n'y a donc pas eu de transfert d'embryons lors de cette expérience.

## DISCUSSION

### 1 Les objectifs

L'hypothèse de départ sur laquelle se sont basées ces trois expériences est la suivante : la pose d'éponges de P4 et l'administration des agonistes du GnRH ont pour but d'inhiber les sécrétions endogènes de FSH et LH. L'inhibition de FSH va bloquer momentanément le recrutement des PF qui vont voir leur pool augmenter. Cette augmentation va engendrer une augmentation des GF suite à la stimulation ovarienne par de la FSH et de la LH exogènes avant d'augmenter le TO et finalement le nombre d'embryons récoltés, après insémination.

### 2 Contexte

Les essais qui ont fait l'objet de ce mémoire ont été programmés dans la lignée d'une série d'autres expériences entamées depuis 2002. C'est l'occasion d'analyser de manière rétrospective et globale certains paramètres qui ont subi des modifications au cours de la dizaine d'essais successifs. Ces résultats, confrontés à ceux de la littérature, constituent une base de discussion sur les apports des expériences réalisées lors de ce mémoire.

### 3 Le blocage hypophysaire

#### 3.1 La pose d'éponges de progestagène

La pose d'éponges de progestagène, lors des protocoles de superovulation, a pour objectif de maintenir une inhibition des décharges préovulatoires de GnRH, de LH et de FSH au niveau du système hypothalamo-hypophysaire. De plus, la P4 exogène provoque une diminution de la sécrétion de P4 endogène et une lutéolyse progressive. Ces éponges sont placées pendant 14 jours, mais il est recommandé de les changer après 7 jours de pose afin d'augmenter leur efficacité. En effet, le relargage constant d'une dose élevée en P4 exogène permettrait d'augmenter le nombre de PF à la surface des ovaires (LEYVA *et al.*, 1997). Afin de vérifier cette hypothèse, une étude a été réalisée sur tous les groupes témoins utilisés dans des protocoles de superovulation depuis février 2003 jusqu'à février 2005. Le nombre de PF obtenus après le traitement progestagène a été comparé avec le nombre de PF présents au départ de l'expérience. Deux groupes de témoins ont été comparés : ceux dont l'éponge a été remplacée le 7<sup>e</sup> jour et ceux ayant gardé leur éponge pendant 14 jours.

*Tableau 39 : population folliculaire des groupes Témoins ayant reçu un traitement progestagènes au cours des années précédentes*

Traitements	Années	Moyenne PF avant traitement	Moyenne	Moyenne PF après traitement	Moyenne
<b>Avec changement d'éponge</b>	février 03	14,7	12,2	17,3	14,7
	février 04	11,0		17,6	
	mars 04	16,0		11,2	
	mai 04	7,4		13,0	
<b>Sans changement d'éponge</b>	septembre 04	16,6	18,0	15,2	18,1
	février 05	19,4		21,0	

La comparaison des moyennes des PF de départ pour les deux groupes de témoins comparés a montré qu'il n'existait pas de différence significative au niveau de la population de PF ( $P = 0,13$ ). De même, après le traitement, la population de PF obtenue dans les deux groupes

est semblable ( $P = 0,33$ ). Le nombre de PF n'augmente de manière significative dans aucun des groupes traités.

Le changement des éponges après 7 jours n'est donc pas une technique capable d'influencer l'émergence des PF chez la brebis Texel.

## 3.2 Les agonistes du GnRH

### 3.2.1 Septembre 2004 et février 2005

Le blocage hypophysaire réalisé avec de fortes doses de Buséréline (100µg/jour + injection de départ de 100µg) et de Décapeptyl (3 mg en une seule injection) a été le plus efficace.

Les taux plasmatiques de FSH chutent considérablement dans les deux groupes ( $P < 0,01$  pour la Buséréline et  $P < 0,05$  pour le Décapeptyl). L'observation de la figure 9 montre que le blocage hypophysaire provoqué par l'injection de Décapeptyl est plus rapide que par la pose des pompes de Buséréline. Cependant, on remarque que le groupe Décapeptyl possède une décharge de LH spontanée pendant l'administration de FSH exogène. Il y aurait donc eu une levée de l'inhibition plus rapide pour ce groupe. L'effet du blocage hypophysaire sur la LH n'a pas pu être observé pour cette expérience, car l'effet se marque sur la pulsativité de cette hormone. Or, il n'y a pas eu de prises de sang sériées pour l'analyse du taux de gonadotrophines.

Lors de la seconde expérience, le blocage hypophysaire n'a pas fonctionné avec les doses réduites de Buséréline (40 µg/jour + injection de 100 µg) et de Décapeptyl (2mg en deux injections). On n'observe pas de diminution du taux de FSH dans les deux groupes suite au traitement.

Le blocage hypophysaire a donné de bons résultats lors de l'expérience de Septembre 2004 et le nombre de PF a augmenté significativement, mais n'a cependant pas été doublé ( $26,2 \pm 11,3$  avant traitement et  $38,3 \pm 14,7$  après traitement), comme le démontrent *COGNIE et al.*, 2003. En général, les GF ont été inhibés, avec une disparition complète des GF chez les brebis traitées au Décapeptyl. Les deux agonistes administrés lors de cette première expérience semblent donc appropriés pour augmenter le nombre de PF et pour diminuer le nombre de GF.

Pour la seconde expérience, le traitement aux GnRHa, qui n'a pas eu d'effet sur les gonadotrophines n'en a eu que très peu sur la population folliculaire. Le lot Buséréline présente une augmentation des PF et une diminution des GF, mais elles ne sont pas significatives. La diminution de la dose de Buséréline n'est pas indiquée pour bloquer la croissance folliculaire. Selon la littérature, un traitement avec la Buséréline (40 µg/jour) pendant 2 semaines supprime les gros follicules, double le nombre des petits et augmente la réponse à la FSH de 50 % (*COGNIE et al.*, 2003). *PICTON et al.*, en 1990, montrent qu'un traitement chronique à la Buséréline permet de diminuer de 40 à 60 % les taux de FSH. De même que *MCNEILLY* et *FRASER*, en 1989, montrent que l'infusion de Buséréline (50 µg/jour) permet une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) des taux de FSH et LH par rapport à un groupe contrôle.

Pourtant, au vu de nos résultats, la diminution de la dose de Buséréline n'est pas recommandable pour la brebis Texel et ce, malgré l'injection de 100 µg de Buséréline lors de la pose des pompes.

Malgré l'absence de diminution de FSH lors du blocage hypophysaire dans le lot Décapeptyl, on observe un nombre de PF qui augmente et une nette diminution des GF. Cependant, il est impossible de dire si c'est la diminution de la dose (2 mg) ou sa répartition (2 x 1 mg) qui a permis d'obtenir ces résultats. Vu l'absence d'effet sur la FSH, il est permis d'envisager un

effet direct du Décapeptyl sur les follicules, effet allant dans le sens d'un blocage de la croissance et/ou d'une inhibition de leur métabolisme.

Des résultats semblables sont obtenus lors de la réalisation d'un pré-traitement avec du Décapeptyl (1,8 mg, injection retard, 22 jours avant FSH) chez la chèvre de race Alpine ou Saanen. La population de gros follicules a été réduite, mais en revanche les nombres de petits follicules n'ont pas été augmentés contrairement à ce qui a été rapporté chez la brebis (BARIL *et al*, 2004).

### 3.2.2 Mai 2005

Le blocage hypophysaire avec une dose élevée de Buséréline (140 µg/ jour + injection de 100 µg) n'a pas été nettement plus efficace. Les taux de FSH ont diminué progressivement, mais la diminution n'est significative qu'après 11 jours de traitement ( $P < 0,01$ ). Les PF ont été augmentés également de manière significative ( $P < 0,05$ ) et les GF ont été totalement inhibés, car, pour les deux groupes traités, il existe une disparition complète des GF après blocage hypophysaire.

### 3.2.3 Analyse globale

Lors des essais précédents, plusieurs doses de Buséréline ont été testées. Certaines ont été testées à nouveau cette année avec comme changement une injection de 100 µg de Buséréline lors de la pose des pompes osmotiques. Une analyse comparative de ces résultats a été réalisée (tableau 39).

*Tableau 40 : Récapitulatif des protocoles d'administration de la Buséréline et de leurs effets sur les taux de FSH et de la population folliculaire à la fin du traitement*

Doses Buséréline (µg)	Expériences	Effet sur FSH	Effet sur PF	Effet sur GF
<b>40</b>	février 2003	NS	NS	S
<b>40 + 100</b>	février 2005	NS	NS	NS
<b>100</b>	mars 2004	NS	NS	NS
<b>100 + 100</b>	septembre 2004	SS	NS	S
<b>140</b>	mai 2004	SS	S	SS
<b>140 + 100</b>	mai 2005	SS	S	SS

NS : non significatif ; S : Significatif ; SS : hautement significatif

On observe une amélioration sur le blocage hypophysaire lors de l'expérience de septembre 2004 comparée à son homologue de mars 2004. Le taux de FSH a considérablement été diminué et le nombre de GF a diminué. Au vu des résultats obtenus lors de l'expérience de septembre 2004, l'injection de 100 µg de Buséréline lors de la pose des pompes semble avoir un effet sur l'efficacité du blocage chez la brebis Texel. Par contre, pour des doses réduites de Buséréline (40 µg/jour), on n'observe aucune modifications. Une dose faible de Buséréline ne permet donc pas de réaliser un blocage hypophysaire chez la Brebis Texel.

Pour les doses élevées de Buséréline (140 µg/jour), les résultats des dosages hormonaux avaient montré l'efficacité supérieure sur les taux plasmatiques de FSH. On observait une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) des taux de FSH, le nombre de PF était augmenté de façon significative ( $P = 0,02$ ) et le nombre de GF était diminué de manière hautement significative ( $P = 0,005$ ). Les mêmes résultats ont été obtenus lors de l'essai de mai 2005.

La Buséréline en dose élevée permettrait donc un blocage hypophysaire idéal et la création d'un pool de petits follicules.

### 3.2.4 Relation FSH-Population folliculaire

Lors des essais réalisés pendant la période de ce mémoire, une corrélation a été mesurée entre la population folliculaire et le taux de FSH lorsque le blocage hypophysaire s'est avéré efficace. Dans les deux expériences, on peut remarquer qu'il existe une corrélation négative entre le nombre de PF lors du blocage hypophysaire et les taux de FSH à la fin de ce traitement. En effet, le nombre de PF décroît en même temps que les taux de FSH augmentent.

D'autres publications vont dans le même sens. *GONZALES-BULNES et al.*, en 2002, montrent que le taux d'ovulation obtenu en réponse à un traitement superovulatoire est étroitement corrélié au nombre et à la taille des follicules présents sur l'ovaire avant la première injection de FSH. Une même conclusion a été tirée dans l'équipe de *BREBION* en 1990. Le nombre final d'embryons transférables est également augmenté quand il a un grand nombre de PF (2-3 mm) et un très faible nombre de GF ( $\geq 6$  mm) au début du traitement superovulatoire (*GONZALES-BULNES et al.*, 2004).

Notre théorie, basée sur les résultats préliminaires de ces différents auteurs, se vérifie donc : en diminuant la sécrétion de FSH, il est possible d'augmenter le pool de PF, que l'on espère recrutables.

## 4 La stimulation ovarienne

### 4.1 Le recrutement des petits follicules

Lors de la stimulation ovarienne par pFSH et pLH, les PF obtenus après blocage vont être recrutés et vont entamer une croissance qui doit mener ces PF au stade de GF et, si possible, de GFPO. La comparaison entre le nombre de PF recrutables et le nombre de GF recrutés détermine le pourcentage de recrutement obtenu lors des expériences (tableau 41).

Tableau 41 : pourcentage de recrutement des PF lors de la stimulation avec pFSH

	Traitement	Septembre 04	Février 05	Mai 05
<b>Témoin</b>		41	73	-
<b>Buséréline</b>	Busé FSH	37	51	27
	Busé Stimufol	-	-	33
<b>Décapeptyl</b>		13	33	-

On observe un pourcentage de recrutement nettement plus élevé (41 et 73) pour les lots Témoin des expériences de septembre 2004 et février 2005. Les lots Buséréline de ces deux expériences présentent tous deux un meilleur taux de recrutement que les lots Décapeptyl.

Lors de l'expérience de mai 2005, le lot Buséréline FSH a un taux de recrutement plus élevé que le lot Buséréline Stimufol. La FSH aurait donc permis un meilleur recrutement que le Stimufol, tandis que le Décapeptyl semble avoir un effet néfaste sur le recrutement et la croissance des follicules, même si son effet sur la FSH n'est pas atteint (février 2005).

Sept brebis ont participé consécutivement aux trois expériences. Il se pourrait que les traitements répétés avec de la FSH et de la LH permettent la formation d'anticorps contre des gonadotrophines. Les taux de recrutement devraient dans ce cas diminuer au fil des expériences. Le tableau 42 reprend les différents taux de recrutement obtenus pour ces sept brebis lors des trois expériences.

Tableau 42 : Taux de recrutement obtenus pour les sept brebis ayant participé aux trois expériences

N° SANITEL	47261	91811	83319	47264	91827	83303	91962	Moyenne
<b>Septembre</b>	24	36	41	44	10	14	11	25,7
<b>Février</b>	69	39	72	0	37	8	57	40,2
<b>Mai</b>	29	44	16	20	20	45	10	26,2

On peut remarquer que les taux de recrutement de la première et de la troisième expérience ne diffèrent pas l'un de l'autre. Par contre, celui de la deuxième expérience est significativement plus élevé ( $P < 0,05$ ). Si des anticorps anti-FSH étaient présents, on observerait une diminution progressive des taux de recrutement lors des expériences. Or le troisième taux de recrutement est semblable au premier.

Une analyse du même type a été réalisée chez *BREBION et al.* (1991) sur des brebis traitées tous les deux mois avec de la pFSH. Une diminution de la réponse est observée, mais elle n'est significative qu'après le 4<sup>e</sup> traitement. L'apparition d'anticorps anti-FSH est proposée comme cause de cette diminution.

Le pourcentage de GFPO obtenus par rapport au nombre de GF recrutés a été calculé pour les différents lots des trois expériences réalisées (tableau 43).

Tableau 43 : Pourcentage des GF préovulatoires après stimulation avec pFSH exogènes

	Traitement	Septembre	Février	Mai
<b>Témoin</b>		56,3	81,8	-
<b>Buséréline</b>	Busé FSH	71,1	84,1	85,7
	Busé Stimufol	-	-	76,5
<b>Décapeptyl</b>		66,7	77,0	-

On peut observer que, lors de l'expérience de septembre et février, la Buséréline présente le meilleur pourcentage de GFPO. Pour l'expérience de mai, le groupe traité avec de la FSH présente le meilleur pourcentage de GFPO. Le Stimufol n'a pas permis de stimuler un grand nombre de GFPO. Le protocole FSH/LH semble donc être toujours le meilleur moyen pour stimuler la maturation des PF en GFPO.

## 4.2 Analyse globale

Les protocoles d'administration de la Buséréline testés lors de ces trois expériences l'ont déjà été les années précédentes. Cependant, aucune injection de Buséréline n'avait été réalisée lors de la pose des pompes. On peut comparer les taux de recrutement des PF de ces expériences à une année d'intervalle (tableau 42).

Tableau 44 : Récapitulatif du taux de recrutement des PF lors des essais des années précédentes

Traitements Buséréline	Années	PF recrutables	GF recrutés	Taux recrutement
40 µg/jour	février 2003	11,6	5,3	48 %
	février 2005	24,8	12,6	51 %
100µg/jour	mars 2004	12,4	8,2	66 %
	septembre 2004	38,3	15,2	37 %
141 µg/jour	mai 2004	22,4	9,4	42 %
	mai 2005	31,2	8,4	27 %

Le nombre de PF obtenus après blocage hypophysaire est augmenté au cours des trois expériences réalisées lors de ce mémoire. L'injection de Buséréline lors de la pose des pompes pourrait donc être un facteur influençant la création du pool de PF. De même, le nombre de GF recrutés est généralement augmenté par rapport aux résultats des années précédentes.

Cependant, on peut remarquer que les taux de recrutement obtenus suite à des traitements de blocage avec des doses de Buséréline supérieures ou égales à 100 µg/jour sont moindres. On peut émettre l'hypothèse que des doses élevées de Buséréline influenceraient négativement la croissance des GF, diminuant ainsi le taux de recrutement et donc le nombre d'ovulations par la suite. C'est ce qui est également observé après utilisation de Décapeptyl.

Il est donc permis de suspecter qu'une activité GnRH très importante est susceptible d'altérer le métabolisme des follicules. Un effet positif d'une quantité physiologique de GnRH est stimulante sur le métabolisme *in vitro* des follicules préovulatoires chez le rat (HILLENSJO, 1984), mais l'effet négatif enregistré ici semble s'exercer plutôt sur le recrutement et le démarrage de la croissance que sur les GFPO. En 2003, SHIGEKI TAKEKIDA *et al.* montrent que le GnRH possède un effet favorisant sur l'apoptose des cellules de la granulosa et ce, sans tenir compte du stade de maturation folliculaire, l'apoptose étant le dernier stade du mécanisme d'atrésie. C'est ce qui expliquerait que l'on obtienne un nombre plus élevé de follicules atrétiques et d'ovocytes préovulatoires de taille réduite dans les protocoles de superovulation et de stimulation ovarienne utilisant le GnRH. Cet effet est d'autant plus important que l'on utilise conjointement le GnRH et des gonadotrophines dans ces protocoles. Toujours selon les mêmes auteurs, le GnRH jouerait son effet néfaste à deux niveaux : au niveau de la prolifération des cellules de la granulosa lors du premier stade de maturation folliculaire et au niveau de la stéroïdogenèse lors du dernier stade de la maturation folliculaire. Ils concluent que le GnRH utilisé dans les protocoles de procréation médicalement assistée entraîne la diminution du nombre d'ovocyte obtenus et la diminution des hormones stéroïdiennes dans le sérum et le fluide folliculaire.

### 4.3 Les taux d'ovulation

Le nombre de CJ et les taux d'ovulation de cette année et des années précédentes ont été récapitulés dans le tableau 45.

*Tableau 45 : récapitulatif des taux d'ovulation obtenus pour la Buséréline lors des expériences de cette année et des années précédentes*

Traitements	Années	TO	Rapport GF/CJ en %
<b>Buséréline 40 µg/jour</b>	février 03	6,8	57
	septembre 04	13,2	122
<b>Buséréline 100µg/jour</b>	mars 04	8,0	95
	février 05	6,2	58
<b>Buséréline 140 µg/jour</b>	mai 04	0,6	32
	mai 05	0,4	6
<b>Décapeptyl</b>	septembre 04	1,8	90
	février 05	9,6	102

Les taux d'ovulation obtenus pour les expériences de septembre 2004 et de février 2005 sont presque équivalents (100 %). Les taux d'ovulation qui dépassent les 100 % peuvent être dus à plusieurs hypothèses : des GF ont été attribués à une catégorie de taille inférieure à ce qu'ils

étaient réellement, des GF n'ont pas été vus et ont donc atteint la maturité sans avoir été répertoriés ou des GF de taille inférieure à 6 mm ont été conduits jusqu'à l'ovulation.

En février 2003, le groupe traité à la Buséréline (40 µg/jour) présente un TO nettement inférieur aux autres groupes traités, contrairement à ce que l'on trouve dans la littérature. *COGNIE et al.* en 1999 montrent qu'un traitement de deux semaines avec un GnRHa (50µg/jour de Buséréline) chez la brebis Lacaune permet d'augmenter le nombre d'ovulations (en augmentant le nombre de PF) et aussi de diminuer les variabilités de réponses au traitement superovulatoire à la pFSH. Les résultats qu'il obtient sont les suivants :

Traitements	PF (1 à 2 mm)	GF (3 à 5 mm)	TO
<b>pFSH seule</b>	9,5 ± 3,6	7,3 ± 1,3	13,2 ± 5,5
<b>GnRHa + pFSH</b>	21,8 ± 5,2	0	19,2 ± 4,1
	<i>P&lt;0,01</i>		<i>P&lt;0,05</i>

Ce prétraitement permet d'éliminer les faibles réponses (– de 5 ovulations) et assure en moyenne la production de 10 embryons transférables et la naissance de 6 à 7 agneaux par donneuse traitée.

Chez la brebis Texel, il apparaît que la Buséréline en dose supérieure à 40 µg est plus efficace pour produire un pool de PF, et donc un grand nombre de GF après stimulation et un plus grand nombre de CJ.

Cependant, en mai 2005, les TO sont extrêmement faibles. C'est la première année où l'on observe autant d'anovulations (6 brebis sur 10). C'est dans le groupe traité avec du Stimufol que le TO est le plus élevé, mais il n'est dû qu'à 2 brebis présentant 6 et 8 CJ.

L'expérience utilisant de la Buséréline à 140 µg/jour est celle qui présente les TO les plus faibles. Les autres expériences présentent des taux de maturation aboutissant à des taux d'ovulation supérieurs à 50 % mais ayant quand même une grande marge de différence l'une par rapport à l'autre. La variabilité entre donneuses reflète des différences génétiques dans l'aptitude à la superovulation (*COGNIE et al.*, 2000).

## 5 Les taux de récolte des embryons

Les années précédentes, plusieurs techniques de récolte ont été testées : récolte chirurgicale et récolte endoscopique. Cette année, une nouvelle méthode a été testée : une méthode de récolte endoscopique à l'aide d'un cathéter souple à ballonnet. Cette méthode possède un avantage non négligeable : elle évite l'apparition d'adhérences post-opératoires. Le tableau 46 reprend les résultats des taux de récolte au cours des différents protocoles de récolte des embryons.

Tableau 46 : Récapitulatif des taux de récolte obtenus depuis 2002

Traitements	Années	CJ	ER	Taux de récolte (%)
<b>Buséréline 40 µg/jour</b>	février 03	34	2	6
	septembre 04	46	2	5
<b>Buséréline 100µg/jour</b>	mars 04	Pas d'insémination		
	février 05	15	3	20
<b>Buséréline 141 µg/jour</b>	mai 04	3 (et 19 CA)	Pas de récolte	
	mai 05	8	0	0
<b>Décapetyl</b>	septembre 04	7	2	28
	février 05	46	11	24



On observe que le nombre de CJ le plus faible est obtenu avec du Décapeptyl en dose élevée. Il est meilleur quand la dose est diminuée et divisée. Cependant, le taux de récolte des embryons reste presque inchangé malgré la hausse de TO. Une étude récente a montré que, chez la chèvre superovulée, un prétraitement au Décapeptyl (1,8mg, injection retard, 22 jours avant FSH) n'augmente pas le taux d'ovulation. De plus, la production d'embryons *in vivo* n'est pas améliorée. En effet, ces chèvres prétraitées possèdent un taux d'œufs collectés et d'œufs fécondés significativement plus faible que chez les chèvres superovulées en l'absence de prétraitement (BARIL *et al*, 2004).

On remarque également que les deux expériences de mai ont abouti à un échec total en ce qui concerne la récolte d'embryons. Lors de l'expérience de mai 2004, les corps jaunes avaient presque tous régressé en corpus albicans. En 2005, le TO a été très faible et de nombreux follicules kystiques envahissaient les ovaires. Cette année, un grand nombre d'anovulations a été observé. Seule une brebis a été collectée, elle présentait 8 CJ en surface de l'ovaire. Cependant, aucun embryon n'a été récolté. Ce mois de mai correspond à la période d'anœstrus le plus profond pour la race *Texel*, qui est très saisonnière. Un effet « saison » peut aussi être suspecté.

Chez la chèvre Alpine ou Saanen, la régression partielle ou totale des corps jaunes est observée au moment de la collecte des embryons pour 10 à 15 % des femelles superovulées avec FSH et ce taux peut être encore plus élevé chez d'autres races (30 %). Chez la brebis, ce phénomène est plus rare et n'est signalé que chez les femelles superovulées ayant un déficit alimentaire énergétique (JABBOUR *et al*, 1991). Ce phénomène existe tant en saison de reproduction qu'en période d'anœstrus (COGNIE *et BARIL*, 2002).

Le nouveau système de collecte (sonde à deux voies) est plus efficace que les précédents. Cependant, le taux de récolte est faible. Cela peut-être dû à plusieurs facteurs : les embryons ont pu ne pas être tous aspirés par le liquide de récolte, ou tous les embryons n'ont pas été repérés lors de la recherche au binoculaire, ou les ovocytes n'ont pas été tous fécondés. Il est fort probable que la première hypothèse soit la bonne. La recherche au binoculaire reste sûre, car plusieurs passages sont réalisés et plusieurs chercheurs examinent le milieu de récolte. En ce qui concerne la qualité des ovocytes et le problème de fécondation ou de survie embryonnaire, le sujet est encore mal documenté. L'insémination intra-utérine est celle qui donne les meilleurs résultats (BARIL *et al* 1993), mais des problèmes de qualité des ovocytes produits dans ces conditions sont de plus en plus suspectés (MERMILLOD, 2005).

## CONCLUSION

Afin d'améliorer les techniques de superovulation chez la brebis Texel, race de moutons la plus répandue dans notre pays, le Laboratoire de Physiologie Animale des FUNDP met en place depuis 2002 différents protocoles de superovulation. Plusieurs essais ont déjà été réalisés les années précédentes, mais on n'est pas encore arrivé à mettre au point un protocole de superovulation reproductible et efficace à tous les niveaux : pool de PF après blocage, nombre de GFPO, taux d'ovulation et taux de récolte.

Cette année, trois expériences ont été mises en place afin de poursuivre ces objectifs. La première expérience s'est déroulée en septembre 2004, en début de saison de reproduction, la seconde s'est déroulée en février, en fin de saison de reproduction, et la troisième en mai, en contre-saison. Le but premier de ces expériences a été d'évaluer les effets des agonistes du GnRH et de voir quel agoniste et quelle dose permettaient d'améliorer les différentes étapes du protocole de superovulation.

La première expérience réalisée au mois de septembre 2004 a utilisé de la Buséréline (100 µg/jour) et du Décapeptyl (une injection de 3 mg). Le blocage hypophysaire a fonctionné d'une part sur les taux de FSH et d'autre part sur la population folliculaire. Nous avons donc pu étudier l'effet positif des agonistes. Les taux d'ovulation sont les meilleurs pour cette expérience.

Lors de la seconde expérience, avec des doses plus faibles (Buséréline 40 µg/jour et Décapeptyl 2 injections de 1 mg), le blocage n'a pas fonctionné à quel niveau que ce soit.

Au vu des résultats obtenus lors de cette expérience, une troisième expérience a été réalisée. Des doses encore plus élevées de Buséréline ont été testées (140 µg/jour), et un nouveau mélange de FSH pour la stimulation ovarienne. Le blocage s'est avéré efficace tant sur les taux plasmatiques de FSH que sur la population folliculaire. Cependant, les taux d'ovulations et de récolte ont été nuls. Le Stimufol testé pour stimuler les ovaires n'a pas donné de résultats concluants. Cette expérience réalisée selon un protocole semblable en mai 2004 semble avoir donné les meilleurs résultats en ce qui concerne le blocage hypophysaire. Mais un effet néfaste de la Buséréline semble exister sur la croissance des GF.

Ce manque d'efficacité dans la troisième expérience peut résulter de plusieurs facteurs : la contre-saison, l'effet inhibiteur de la Buséréline sur la croissance folliculaire lors de la stimulation gonadotrope, la formation d'anticorps contre les pFSH exogènes, la qualité des gonadotrophines injectées aux animaux et enfin les répétitions de traitements superovulatoires.

## PERSPECTIVES

Afin d'améliorer et d'optimiser les protocoles de superovulation et de transfert embryonnaire chez les ovins, plusieurs perspectives peuvent être envisagées.

En ce qui concerne les plannings des expériences futures, l'utilisation de la Buséréline reste un choix intéressant. La Buséréline est jusqu'à présent l'agoniste le plus efficace dans les protocoles superovulatoires lorsqu'elle est utilisée avec des doses élevées. Cependant, le protocole utilisant la Buséréline en dose maximale a été réalisé deux fois en période d'œstrus. Cette période n'étant pas favorable, il serait plus judicieux de le tester en pleine saison de reproduction. De même que le Stimufol, utilisé pour la stimulation ovarienne, mérite d'être également

utilisé en saison de reproduction. Son efficacité ne peut être évaluée définitivement sur une seule dans des conditions comme celles existant cette année.

Il serait également intéressant d'évaluer le blocage hypophysaire sur les taux endogènes de LH. Ceci n'a pu être observé auparavant, car la LH est sécrétée de manière pulsatile. Et comme les prises de sang réalisées ne sont pas sériées, elles ne reflètent pas la pulsatilité de l'hormone. On pourrait donc changer l'intervalle entre les prises de sang en les réalisant en série afin d'évaluer la pulsatilité de l'hormone et l'effet des agonistes sur celle-ci.

Le transfert embryonnaire en lui-même mérite une attention particulière. Premièrement, il serait idéal de connaître l'historique de chaque brebis employée. En effet, certaines brebis utilisées lors des trois expériences de cette année semblent répondre de meilleure façon au protocole superovulatoire que d'autres. Il serait donc intéressant de sélectionner les brebis et d'établir des critères de sélection qui permettent d'estimer préalablement l'aptitude d'un animal à répondre à ces traitements de superovulation et de production d'embryons.

Deuxièmement, au vu des résultats obtenus lors de ces expériences, le Décapeptyl n'atteint pas les objectifs poursuivis. Cependant, sa facilité d'utilisation lui confère un avantage estimable. En effet, une seule injection est requise pour son administration, alors que la Buséréline nécessite une double intervention chirurgicale locale. Il faudrait essayer de trouver un agoniste du GnRH aussi facile d'utilisation que le Décapeptyl, mais présentant l'efficacité de la Buséréline. Chez la jument, un implant de Desloreline (Ovuplant®) est utilisé avec succès. On pourrait imaginer un système semblable chez la brebis. Chez la femme, l'implant de Goséréline (Zoladex®) est utilisé lors des protocoles de procréation médicalement assistée. Il est composé de 3,6 mg d'acétate de goséréline qui est un analogue du GnRH, comme la Buséréline. Il permet une désensibilisation de l'hypophyse et donc une diminution des taux de FSH et LH plasmatiques. Il faudrait trouver un équilibre entre une dose qui bloque l'hypophyse et n'interfère pas négativement dans l'activité folliculaire elle-même.

Troisièmement, il serait intéressant d'essayer de trouver d'autres produits permettant la stimulation ovarienne. La pFSH et pLH du Département de Médecine Vétérinaire de l'Ulg est à ce jour de loin la plus efficace. Cependant, elles sont utilisées à titre expérimental et leur utilisation à grande échelle ne serait pas possible. Un autre produit, comme le Stimufol ou l'Ovagen®, permettrait un coût raisonnable.

Et, quatrièmement, la méthode de récolte des embryons testée lors de cette expérience (laparoscopie avec sonde 2 voies) donne des résultats très satisfaisants par rapport à ceux des expériences précédentes (par chirurgie). Cette technique, cependant, nécessite un « tour de main » de l'utilisateur. Il serait donc judicieux de continuer à utiliser cette technique afin de l'améliorer, notamment en mettant au point les volumes et méthodes de rinçage utérin.

D'autres études complémentaires permettraient de comprendre au mieux les effets des agonistes du GnRH sur les ovaires. Une étude *in vitro*, par exemple, pourrait être envisagée dans les années à venir. Le Décapeptyl et la Buséréline verraient leurs effets identifiés de façon plus détaillée. Il serait intéressant de savoir s'ils ont ou non un effet inhibiteur sur la croissance des follicules.

En conclusion, les méthodes de transplantation embryonnaire restent des techniques très prometteuses pour multiplier la descendance des brebis d'élites dans les é

## Bibliographie

- ARCHA B., CHENTOUF M., BISTER J.L., BELLEFLAMME A., REVAVILLE R., PAQUAY R. Effect of two GnRH agonist pre-treatment on superovulatory responses in ewes. Réunion du 13 mai 2005 : Compétence au développement de l'ovocyte de Mammifère et qualité embryonnaire.
- ARMSTRONG D.T. and EVANS G., Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, vol. 19, n° 1, 31-42 (1983).
- ARMSTRONG D.T. and EVANS G. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod.Fert.*, **70**, 47-53 (1984).
- BARI F., KHALID M., HARESIGN W., MURRAY A. and B. MERREL. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, vol. **59**, issues 5-6, 1265-1275 (2003).
- BARIL G., BREBION P. et CHESNE P. Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. *Étude FAO production et santé animale*, **115**, ISBN 1014-1197 (1993).
- BARIL G. *et al.* Effet de prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis et la chèvre. *Renc. Rech. Ruminants*, **11**, (2004)
- BARTLEWSKY P.M., ARAVINDAKSHAN J., BEARD A. P., NELSON M. L., BATISTA- ARTEGA M., COOK S. J., RAWLINGS N. C. Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin releasing-Hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science*, **81**, 63-75, (2004).
- BISTER J.-L., Cycle sexuel des mammifères femelles. *Probio-Revue*, vol. 5/2, 167-182, (1982).
- BISTER J.-L., ARTOISENET P., PAQUAY R., Traitements hormonaux et fécondité de la brebis Texel en période normale de lutte. *Revue de l'agriculture*, n° 5, vol. **36**, 1451-1458 (1983).
- BISTER J.-L., DERIJCKE G., MEERSCHAERT A., PAQUAY R. Reports about intra-uterine artificial insemination with laparoscopy in Texel and Suffolk sheep, *FUNDP* (1989).
- BISTER J.-L., Physiologie spéciale 2 : Système digestif et nutrition, système excréteur et système reproducteur. *FUNDP* (2000).
- BISTER J.-L., La reproduction assistée chez l'homme et les mammifères domestiques. *FUNDP* (2004).
- BRANKA A., MARONGIU M.I., BOMBOI G., GALLUS M., FLORIS B., PELLICCIA C., HUMBLLOT P. Effet de la buséréline administrée 24 heures avant l'insémination artificielle de brebis de race Sarde : dynamique folliculaire post-ovulatoire et niveaux plasmatiques de LH, de 17 $\beta$ œstradiol et de progestérone. *Renc. Rech. Ruminants*, **9**, (2002).
- BREBION P. and COGNIÉ Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. *5<sup>th</sup> Scientific Meeting of European Embryo transfert Association*, Lyon, France, **1** : 106 (1989).
- BREBION P., COGNIÉ Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pré-treatment. *5<sup>th</sup> Scientific Meeting of European mbryo Transfer Association*, Lyon, France, **1** : 106 (1989).

- BREBION P., BELLOC J. P., BROIS M. Elite Lacaune ewes pretreated with a GnRH antagonist yield more usable embryos following pFSH. In: *Proceeding of the 6<sup>th</sup> Meeting European Association for Embryo Transfer*; December [Abstract], 1990.
- BREBION P., BECKERS JF, GUERIN Y, BOOMAROV. Hight performance of Boorola x Romanov ewes as permanent embryos donors. In: ELSSEN JM, BODIN L AND THIMONIER J (eds), Major genes for reproduction in sheep, Colloques de l'INRA n° 57, 171-174, Editions INRA, Paris, (1991).
- CAMPBELL, Biologie : la reproduction chez les animaux, De Boeck université, chapitre 42, 931-955 (2000).
- CAMPBELL B. K., SCARAMUZZI R. J. Effects of acute immunoneutralization of inhibin in ewes during the late luteal phase of the oestrous cycle on ovarian hormone secretion and follicular development during the subsequent follicular phase. *Reprod. Fertil.*, **104** (2) : 337-45 (1995).
- CHEMINEAU P., COGNIE Y., HEYMAN Y., Maîtrise de la reproduction des mammifères d'élevage INRA, *Productions animales*, hors série, 5-15 (1996).
- COGNIE Y., State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, **51**, 105-116, (1999).
- COGNIE Y., BARIL G., POULIN N., BECKERS J. F. The ovulation rate obtained after a superovulatory treatment associating GnRH antagonist and pFSH is highly repeatable. *16<sup>th</sup> Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association*, Santander, **130**, (Abstr.) (2000).
- COGNIE Y., BARIL G., Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. INRA, *Productions animales*, **15**, 199-207 (2002).
- COGNIE Y., BARIL G. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, **59**, 171-188 (2003).
- COLLEAU J.-J., HEYMAN Y., RENARD J.-P. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. INRA, *Productions animales*, **11**, 41-56 (1998).
- COONROD S. A., BOWEN J., KRAEMER D. C. Non-surgical collection of ovine embryos. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> Ann. Convention of the American Embryo Transfer. Assoc.*, 83-87 (1984).
- COONROD S. A., COREN B.R., MCBRIDE B. L., BOWEN M. J., KRAEMER D. C. Successful non surgical collection of ovine embryos. *Theriogenology*, **25** : 149 (1986).
- DEGHENGI R., BOUTIGON F., WÜTHRICH P., LENAERTS V., Antarelix a novel soluble LHRH antagonist. *Biomed & Pharmacother*, **47**, 107-110 (1993).
- DITTKOFF E. C., CASSIDENTI, PAULSON R. J., SAUER M. V., WELLINGTON L. P., RIVIER J., YEN S.S.C., LOBO R.A. The gonadotrophin-releasinh hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 1811-1817 (1991).
- DOBRINSKY J. R., Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, vol. **57**, 285-302 (2002).
- DOBSON H., CAMPBELL B. K., SCARAMUZZI, R. J. Use of a GnRH antagonist in conjunction with low amplitude, hight frequency LH pulses to induce follicular growth without an LH surge and ovulation in ewes. *Elsevier Science*, **46**, 213-222 (1997).

- DOGAN I., NUR Z., GUNAY U., SAGIRKAYA H., SOYLU M. K., SONWEZ C., Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does, *Vet. Med., Czech*, **50**, (1), 33-38, (2005).
- DRIANCOURT M. A., GOUGEON A., ROYERE D., THIBAUT C., La fonction ovarienne. In : Thibault C., Levasseur M. C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Éditions Ellipse*, Paris (1991).
- EVANS G., BROOKS J., STRUTHERS W. and MCNEILLY A. S., Superovulation and embryo recovery in ewes treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist and purified follicle-stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 247-52 (1994).
- FELBERBAUM R. E., LUDWIG M., DIEDRICH K., Clinical application of GnRH-antagonists. *Molecular and cellular endocrinology*, **166**, 9-14 (2000).
- FLEMING R., YATES R. W. S., HAXTON M. J., COUTTS, J. R.T., Ovulation induction using the combination of buserelin and exogenous gonadotrophins in women with functional pituitaries. *The British Journal of Clinical Practice*, supplément **48**, vol. 41/4 (1987).
- GONZALES-BULNES A., SANTIAGO-MORENO J., COCERO M. J., LOPEZ-SEBASTIAN A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes, *Theriogenology*, **54**, 1055-1064, (2000).
- GONZALES-BULNES A., GARCIA-GARCIA R. M., SOUZA C. J. H., SANTIAGO-MORENO J., LOPEZ-SEBASTIAN A., COCERO M. J. and BAIRD D. T., Patterns of follicular growth in superovulated sheep in influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Animal*, **37**, 357-361 (2002).
- GONZALES-BULNES A., GARCIA-GARCIA R. M., SANTIAGO-MORENO J., LOPEZ-SEBASTIAN A., COCERO M. J. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose, *Theriogenology*, **58**, 1607-1614, (2002).
- GONZALES-BULNES A., SANTIAGO-MORENO J., COCERO M.J., SOUZA C.J.H., GROOME N.P., GARCIA-GARCIA R.M., LOPEZ-SEBASTIAN A., BAIRD D.T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, **57**, 1263-1272, (2002).
- GONZALES-BULNES A., GARCIA-GARCIA R.M., SANTIAGO-MORENO J., ARITZANAVARRETTA C., DOMINGUEZ V., LOPEZ-SEBASTIAN A., TRESGUERRES J. A., COCERO M. J. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Dpto. De reproduction Animal, INIA*, **43** (1) : 17-28 (2003).
- GONZALES-BULNES A., SANTIAGO-MORENO J., GARCIA-GARCIA R.M., SOUZA C.J.H., LOPEZ-SEBASTIAN A., MCNEILLY A.S., Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology*, **61**, 977-985, (2004)
- GONZALES-BULNES A., VEIGA-LOPEZ A, GARCIA P., GARCIA-GARCIA R.M., ARIZNAVARRETTA C., SANCHEZ M.A., TRESGUERRES J.A.F., COCERO M.J., FLORES J.M., Effects of progestagens and prostaglandine analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*, **63**, 2523-2534 (2004).
- GONZALES-BULNES A., BERLINGER F., COCERO M. J., GARCIA-GARCIA R. M., LEONI G., NAITANA S., ROSATI I., SUCCU S. AND VEIGA-LOPEZ A., Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances *in vivo* and *in vitro* blastocyst output in sheep. *Theriogenology*, in Press<sup>2</sup>(2005).

- GONZALES-BULNES A., LOPEZ-SEBASTIAN A., GARCIA-GARCIA R.M., VEIGA-LOPEZ A., SOUZA C. J. H., MCNEILLY A. S., Restoration of endocrine and ovarian function after stopping GnRH antagonist treatment in goats. *Theriogenology*, **63**, 83-91 (2005).
- GOODMAN R. L., KARSH F. J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone : differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, **107**, 177-86, (1991).
- GORDON I., Reproduction in sheep and goats, Controlled Reproduction in farm animals series, 2, Cab international, ISBN : 0-85199-1157 (1997).
- HAENLEIN G. F. W., CACCESE R., Anatomy and physiology, *Collection Goat handbook* (1992).
- HANZEN CH. La production d'embryons *in vivo*. 2<sup>e</sup> Doctorat (2004-2005). (<http://www.fmv.ulg.ac.be/oga/dloads/Doc2Notes/Ch31.doc>).
- HEDON B. *et al.*, L'inhibition de LH au cours de la stimulation de l'ovulation pour fécondation *in vitro*. *Reprod.-Metab.*, vol. **3**, n° 3, 173-177 (1986).
- HILLENSJO T., EKHOLM C., HEDIN. Effect of gonatropin releasing hormone upon the pattern of steroidogenesis in isolated preovulatory rat follicles. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 105 (1) : 105-11 (1984).
- JABBOUR H.N. and EGANS G. Superovulation of Merino ewes with an ovine pituitary follicle stimulating hormone extract. *Reprod. Fertile. Dev.*, **3**, 561-9, (1991).
- JABBOUR H. N. and EVGANS G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and or/FSH-P. *Animal Reproduction Sciences*, **26**, 93-106, (1991).
- LECLERCQ L. Première approche de la maturation et de la fécondation *in vitro* de l'ovocyte ovin (1994).
- LEYVA V., BUCKRELL B.C., WALTON J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* **50**, 395-416, (1998).
- LOPES DA COSTA L., CHAGAS E SILVA L. and ROBALO SILVA J., Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, **56** : 65-77 (2001).
- LOPEZ-ALONSO C., ENCINAS T., GARCIA-GARCIA R.M., VEIGA-LOPEZ A., ROS J.M., MCNEILLY A.S., GONZALES-BULNES A. Administration of single short-acting doses of GnRH antagonist modifies pituitary and follicular function in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* (2005).
- LOPEZ-SEBASTIAN A., GONZÁLEZ DE BULNES A., DANTIAGO MOERNO J., GÓMEZ BRUNET A., TOWNSEND E. C. END INSKEEP E. K. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, **52**, 505-514 (1999).
- MARCQ F., LEROY P. L. Le secteur ovin en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, **141**, 291-302, (1997).
- MCKELVEY, W. A, ROBINSON, AITKEN R. P. A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. *The veterinary record*, vol. **117**, n° 19, 492-494 (1989).
- MCLACHLAN, ROBERT I., DAVID L., HEALY et HENRY G. Burger. Clinical aspects of LHRH analogues in gynaecology. *British journal of obstetrics and gynaecology*, vol. **93**, 434-454 (1986).
- MCMILLAN W. H. and HALL D. R. H. Laparoscopic transfer of ovine and corvine embryos using the transpic technique. *Theriogenology*, vol. **42**, n° 1, 137-146 (1994).

- MCNEILLY A. S., FRASER H. M., Effect of gonadotrophine-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *Endocrinology*, **115** (2), 273-82 (1987).
- MEERSCHAERT A., BISTER J.-L., DERYCKE G., PAQUAY R. Reproductive performances in the Texel ewe : effect of the PMSG-Dose, of the animal's age and of the season. Third world congress on sheeppard, *Beef cattle breeding*, vol. **2** (INRA), (1988).
- MERMILLOD, Communication personnelle, Journée de la physio, INRA-Nouzilly, juin 2005.
- MITCHELL L.M., DINGWALL W.S., MYLNE M.J.A, HUNTON J., MATTHEWS, GEBBIE G.J., MCCALLUM G.J., MCEVOY T.G., Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Animal Reproduction Science*, **74**, 163-174, (2002).
- MIZUMACHI M., VOGLMAYR JK, WASHINGTON DW, CHEN CL, BARDIN CW. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle-stimulating hormone levels. *Endocrinology*, **126** (2) : 1058-63 (1990).
- MYLNE M.J.A., MCKELVEY W.A.C., FERNIE K., MATTHEWS K. Use of transcervical technique for embryo recovery in sheep. *The Veterinary Record*, **16** : 450-451 (1992).
- NELSON L.R., FUJIMOTO VY, JAFFE R.B., MONROE SE. Suppression of follicular phase pituitary-gonadal function by a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist with reduced histamine-releasing properties (ganirelix). *Fertil Steril*, **63**, 963-9, (1995).
- NOËL B., BISTER J.-L. and PAQUAY R., Follicular events during the cycle in Suffolk ewes. *The control of animal reproduction*, **6** (1991).
- NOËL B., BISTER J.-L. and PAQUAY R., The control of fertility in ewe : ovarian responses to progestagen-PMSG treatment at different periods of the year. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, vol. **99**, pp. 39, (1991).
- PADULA A.M., MACMILLAN K. L., Oestradiol-17 $\beta$  responsiveness, plasma LH profiles, pituitary LH and FSH concentrations in long-term ovariectomised Holstein cows at 24h, 48h and 21days following treatment with an absorbable GnRH agonist implant. *Animal reproduction science*, **85**, 27-39, (2005).
- PICAZO R. A., COCERO M. J., BARRAGAN M. L. AND LOPEZ SEBASTIAN A. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*, **45** : 1065-1073, (1996).
- PICTON H. M., TSONIS C. G. and MCNEILLY A. S., The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Journal of Endocrinology*, **127**, 273-283 (1990).
- RYAN J. P., HUNTON J. R., MAXWELL W. M .C. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH-P. *Reprod. Fert. Dev.*, **3**, 551-560 (1991).
- SHIGEKLI TAKEIDA, HIROYA MATSUO, TAKESHI MISUO. GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **202**, 155-166 (2003).
- SUGIE T., SOMA T., TSUNODA and K. MIZOUCHI. Survival rates of the embryo during transfer in farm animals (1989).



THATCHER W.W., DROST M., SAVIO J.D., MACMILLAN K.L., MORRIS G.R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal reproduction science*, vol. **33**, Issues 1-4, pp. 27-49 (1993).

THIBAUT C., LEVASSEUR M. C., La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Coédition INRA-Ellipse*, Paris, 928 p (2001).

TORRÈS S. and SEVELLEC C., Repetead superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nurt. Develop.*, 27 : 859-863 (1987).

VALLET J.-C., CASAMITJANA P., BREBION P., PERRIN J., Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Rec. Med. Vet.*, **167**, 293-301 (1991).

VEIGA-LOPEZ A., GONZALES-BULNES A., GARIA-GARCIA R. M., DOMINGUEZ V., COCERO M. J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, **63**, 1973-1983 (2005).

YOUNG J., GOUGEON A., SCHAISON G., Le cycle ovarien. *Médecine/sciences*, **15** : 183-190 (1999).

## Références électroniques

### **Cours en ligne sur la reproduction ovine :**

<http://www.refer.org.ma/ovirep/cours2/hormones.html>

### **Gonadotrophines et médicaments agissant sur leur libération, 2004, CBIP VET :**

<http://www.cbip-vet.be/fr/texts/FGHOOOL1DL2o.lasso>

### **Manipulations des gamètes et des embryons, 2003, UCL :**

[http://didactique.sc.ucl.ac.be/VETE1250/Embryologie\\_chap4.htm](http://didactique.sc.ucl.ac.be/VETE1250/Embryologie_chap4.htm)

### **Hormones sexuelles hypothalamo-hypophysaires, 2002, pharmacorama :**

[http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Hormones\\_antahypophysaires3.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Hormones_antahypophysaires3.php)

### **CHW, Catholic Healthcare West, « About goserelin », 2003:**

<http://www.chw.healthonline.com/modules/goldstandard/monograph.asp?cpnum=281&name=Goserelin>

### **Information médicale du Compendium Suisse des Médicaments®, « Zoladex® », 2001 :**

[http://www.kompendium.ch/data/fi\\_f/fk03447\\_.htm](http://www.kompendium.ch/data/fi_f/fk03447_.htm)

### **Rxlist.com, «Cetrorelix», 2003:**

[http://www.rxlist.com/cgi/generic2/cetrorelix\\_cp.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic2/cetrorelix_cp.htm)

### **Les inducteurs de l'ovulation, 2005 :**

<http://www.gyneweb.fr/Sources/gyngene/gynendoc/inductovul.html>

### **The Medical Letter, « Assisted reproductive technologies », 2005:**

<http://sitemarker.umich.edu/rei/files/art.pdf>

**ICP Bio OVAGEN, 2005 :**

<http://www.icp.co.nz/>

levages. Cependant, le protocole superovulatoire mérite d'être amélioré afin de diminuer les variabilités individuelles et d'assurer ainsi une réussite constante de ces protocoles.

## TABLE DES MATIERES

FACULTE DES SCIENCES .....	5
Introduction .....	9
Revue bibliographique .....	11
1 Le système reproducteur et le cycle sexuel de la brebis .....	11
1.1 Le système reproducteur .....	11
1.1.1 Vue générale.....	11
1.1.2 Ovaires .....	11
1.2 Le cycle sexuel de la brebis.....	13
2 Traitement Superovulatoire.....	16
2.1 Contrôle du moment de l'ovulation .....	16
2.1.1 Utilisation de progestagènes.....	16
2.1.2 Utilisation de prostaglandines .....	17
2.2 Contrôle du taux d'ovulation.....	18
2.2.1 Stimulation avec PMSG .....	18
2.2.2 Stimulation avec FSH et LH .....	18
2.2.3 Stimulation avec hCG .....	20
2.2.4 Immunisation contre les stéroïdes endogènes .....	20
2.3 Préparation de l'ovaire .....	20
2.3.1 Les agonistes .....	21
2.3.2 Les antagonistes .....	22
3 L'insémination .....	25
3.1 Généralités.....	25
3.2 Méthodes d'insémination .....	25
4 Collecte et transfert des embryons .....	27
4.1 Principe.....	27
4.2 Intérêt de la transplantation embryonnaire.....	27
4.3 Collecte d'embryons .....	27
4.3.1 Principe général.....	27
4.3.2 Les différentes méthodes de collecte .....	28
4.4 Conservation des embryons .....	28
4.5 Sélection des embryons.....	28
4.6 Induction de l'œstrus et de l'ovulation chez les femelles receveuses .....	29
4.7 Le transfert d'embryons .....	29
4.7.1 Facteurs de réussite du transfert .....	29
4.7.2 Les méthodes de transfert.....	30
5 Objectifs de ce mémoire.....	31
1 Animaux utilisés.....	32
1.1 Les brebis donneuses.....	32
1.2 Les brebis receveuses .....	32
1.3 Produits utilisés .....	33
2 Plan expérimental .....	33
2.1 Objectifs des différentes expériences .....	33
2.1.1 Expérience n° 1 .....	33
2.1.2 Expérience n° 2 .....	35
2.1.3 Expérience n° 3 .....	35

3	Manipulations des animaux.....	36
3.1	Prises de sang .....	36
3.2	Pose des pompes osmotiques .....	36
3.3	Pose des éponges .....	36
3.4	Observation des ovaires .....	36
3.5	Insémination .....	37
3.5.1	Récolte du sperme .....	37
3.5.2	Insémination intra-utérine .....	37
3.6	Collecte d'embryons .....	37
3.6.1	Collecte par laparoscopie .....	37
3.6.2	Recherche des embryons .....	38
3.6.3	Conservation des embryons - Vitrification .....	38
3.7	Transfert des embryons .....	38
4	Dosage radioimmunologique (RIA).....	39
4.1	Principe du dosage .....	39
4.2	Protocole des dosages FSH et LH .....	39
4.2.1	Protocole pour le dosage de la FSH .....	39
5	Analyses statistiques .....	40
1	Résultats de l'expérience de septembre 2004 .....	42
1.1	Résultats du blocage hypophysaire .....	42
1.1.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH.....	42
1.1.2	Les populations folliculaires .....	43
1.1.3	Analyse.....	44
1.2	Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH .....	44
1.2.1	Injections de pFSH et pLH.....	44
1.2.2	Population folliculaire .....	45
1.2.3	Analyse.....	45
1.3	Résultats du taux d'ovulation (T.O) et de la récolte des embryons .....	47
1.3.1	Le taux d'ovulation .....	47
1.3.2	Analyse.....	47
1.3.3	Le transfert des embryons .....	48
2	Résultats de l'expérience de février 2005 .....	50
2.1	Résultats du blocage hypophysaire .....	50
2.1.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH.....	50
2.1.2	Les populations folliculaires .....	51
2.1.3	Analyse.....	52
2.2	Résultats de la stimulation ovarienne FSH/LH .....	52
2.2.1	Injections de pFSH et pLH.....	52
2.2.2	Les populations folliculaires .....	53
2.2.3	Analyse.....	53
2.3	Résultats du taux d'ovulation (T.O.) et de la récolte des embryons .....	54
2.3.1	Le taux d'ovulation .....	54
2.3.2	Analyse.....	55
2.3.3	Collecte et transfert des embryons .....	56
3	Résultats de l'expérience de mai 2005 .....	58
3.1	Rappel des objectifs .....	58
3.2	Le Blocage hypophysaire .....	58
3.2.1	Évolution des taux plasmatiques de FSH et LH.....	58
3.2.2	Population folliculaire .....	59
3.2.3	Analyses .....	59

3.3	La stimulation ovarienne.....	60
3.3.1	Injections de FSH et LH purifiées.....	60
3.3.2	Point de vue ovarien.....	60
3.3.3	Analyse.....	61
3.4	Résultats du taux d'ovulation et de la récolte des embryons .....	62
3.4.1	Le taux d'ovulation .....	62
3.4.2	Analyses .....	63
3.4.3	La récolte des embryons.....	64
1	Les objectifs .....	65
2	Contexte .....	65
3	Le blocage hypophysaire.....	65
3.1	La pose d'éponges de progestagène .....	65
3.2	Les agonistes du GnRH.....	66
3.2.1	Septembre 2004 et février 2005 .....	66
3.2.2	Mai 2005 .....	67
3.2.3	Analyse globale .....	67
3.2.4	Relation FSH-Population folliculaire.....	68
4	La stimulation ovarienne.....	68
4.1	Le recrutement des petits follicules.....	68
4.2	Analyse globale .....	69
4.3	Les taux d'ovulation.....	70
5	Les taux de récolte des embryons .....	71